

MARCOS LUIZ PESSATTI

**FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES BIOATIVOS DO
VENENO DE *BOTHROPS COTIARA***

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1994

22.188

ORIENTADORES: Profa. Dra. Madalena Baron

Prof. Dr. José Domingos Fontana

MARCOS LUIZ PESSATTI

FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES BIOATIVOS DO
VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Profa. Dra. Madalena Baron

Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Profa. Dra. Muriel Mourão Vieira

Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado

Instituto Butantan, São Paulo

Curitiba, 2 de dezembro de 1994

A minha esposa Tânia,
com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dra. Madalena Baron e Dr. José Domingos Fontana, pela orientação deste trabalho.

A Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelo fornecimento do veneno da serpente *Bothrops cotiara*, pela amizade e incentivo.

A Professora Dra. Glaci Zancan, pelo fornecimento dos aminoácidos, e pelas sugestões e incentivo.

Ao Professor Dr. Fernando Lanças, do Laboratório de Cromatografia da USP-São Carlos, pela participação na etapa de eletroforese capilar, e pelas sugestões.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Frischmann-Aisengart, representado por Edmir Fernandes, pela determinação espectrofotométrica do teor de zinco.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas, representado pelo Cândido, pelo fornecimento dos animais necessários para a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Momoyo Nakano, pelo empréstimo do espectrofotômetro.

Ao Sérgio Abrahão Morato, do Museu de História Natural de Curitiba, pela amizade e pelos auxílios nunca negados.

Aos meus pais, Juvenal e Marinha, por me criarem com dedicação, e a minha família e de minha esposa, pelo apoio, incentivo e amor sempre presentes.

Ao Gil, Cláudia e Lucas, pelas sugestões, pela colaboração, participação, amizade e carinho em todas as etapas.

Aos amigos Nelson Kogan e Augusto Franzosi, pela amizade e hospitalidade.

Ao amigo Wilson Fernandes, pela solidariedade a mim dispensada.

Ao amigo Mário Galhiane, pelo companheirismo e hospitalidade.

Ao irmão em Cristo, Marcelo Maraschin, a gratidão da fraternidade.

A Francisco Deschamps, pelos diálogos de estímulo.

Aos amigos verdadeiros, pela grande ajuda nesta caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Quimiobiotecnologia de Biomassa, Florêncio, Eduardo, Nancy, Adriane, Lorenzo e Walliana, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica, pelo companheirismo e carinho.

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela atenção e auxílio prestados.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e a todos os professores, colegas e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES, pelo suporte financeiro fornecido durante o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... v

SUMÁRIO..... vii

LISTA DE ABREVIATURAS..... x

LISTA DE TABELAS xii

LISTA DE FIGURAS xiii

ABSTRACT..... xv

RESUMO..... xvii

1. INTRODUÇÃO 1

 1.1. TOXINAS HEMORRÁGICAS..... 2

 1.1.A. MECANISMO DE AÇÃO DAS TOXINAS HEMORRÁGICAS 10

 1.2. L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO) 12

 1.2.A. APLICAÇÕES DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE..... 17

2. OBJETIVOS 19

3. JUSTIFICATIVAS..... 20

4. MATERIAIS..... 22

 4.1. OBTENÇÃO DO VENENO..... 22

 4.2. ANIMAIS..... 22

 4.3. EQUIPAMENTOS..... 22

 4.4. SUBSTRATOS 23

 4.5. ENZIMAS 24

 4.6. MATERIAIS PARA ELETROFORESE E CROMATOGRAFIA..... 24

 4.7. OUTROS MATERIAIS..... 24

5. MÉTODOS.....	25
5.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	25
5.2. PREPARAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	25
5.2.1. GEL DE SEPHADEX.....	25
5.2.2. DEAE-CELULOSE.....	26
5.2.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC).....	26
5.3. ISOELETROFOCALIZAÇÃO.....	26
5.3.1. ZIMOGRAMA.....	27
5.4. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A CASEÍNA.....	27
5.5. ATIVIDADE COAGULANTE "THROMBIN-LIKE".....	28
5.6. ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	28
5.7. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE.....	29
5.8. ANÁLISE ESPECTRAL DA COENZIMA.....	29
5.9. ANÁLISE DE ZINCO.....	30
5.10. ELETROFORESE CAPILAR.....	30
6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	31
6.1. FRACIONAMENTO DAS TOXINAS HEMORRÁGICAS DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	31
6.1.A. PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100.....	31
6.1.B. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE- CELULOSE.....	34
6.1.C. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE: ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	38
6.1.D. ANÁLISE DO TEOR DE ZINCO NO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	40
6. 2. FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE A CASEÍNA DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	41

6.3. FRACIONAMENTO DA ATIVIDADE COAGULANTE "THROMBIN-LIKE" DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	45
6.4. FRACIONAMENTO DAS ISOENZIMAS DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO) DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	50
6.4.A. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO) DO VENENO BRUTO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i> SOBRE VÁRIOS SUBSTRATOS.....	54
6.4.B. ANÁLISE ESPECTRAL DA COENZIMA PARA A L-AMINOÁCIDO OXIDASE	55
6.5. SUMÁRIO DOS PROCEDIMENTOS DE FRACIONAMENTO EM GEL DE SEPHADEX E EM DEAE-CELULOSE DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i>	57
6.6. ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) DO VENENO BRUTO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i> E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	59
6.6.1. IEF EM GEL DE POLIACRILAMIDA CORADA COM COOMASSIE	59
6.6.2. IEF ACOPLADA AO ZIMOGRAMA	60
6.7. FRACIONAMENTO DO VENENO DE <i>BOTHROPS COTIARA</i> EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (H.P.L.C.)	62
6.7.1. UTILIZANDO COLUNA DE TROCA IÔNICA	62
6.7.2. UTILIZANDO COLUNA DE FILTRAÇÃO EM GEL	63
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÕES	75
9. BIBLIOGRAFIA.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.	-	Atividade coagulante
A.H.E.	-	Atividade Hemorrágica Específica
AIDS	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALA	-	Ácido δ -aminolevulínico
BAEE	-	N- α -benzoil-L-arginina etil éster
CM	-	Carboxi-metil
DEAE	-	Dietil-aminoetil
DFP	-	Diisofluorpropilfosfato
DL50	-	Dose mínima letal 50 %
DMH	-	Dose mínima hemorrágica
D.O.	-	Densidade óptica (absorbância)
EDTA	-	Etileno-diamino-tetra acetato
FAD	-	Flavina adenina dinucleotídeo
FPLC	-	Cromatografia líquida de rápida performance
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance (resolução)
I.C.	-	Índice de coagulação
IEF	-	Isoeletrofocalização
IP	-	Índice de proteólise

kDa	-	Quilo Dalton
Kcat	-	Constante de catálise
Km	-	Constante de Michaelis & Menten
LAO	-	L-aminoácido oxidase
PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI	-	Ponto isoeletrico
PM	-	Peso molecular
PMSF	-	Fenilmetilsulfonil fluoreto
rpm	-	rotações por minuto
TAME	-	p- toluenosulfonil- L- arginina metil éster
TCA	-	Ácido tricloro-acético
TH	-	Toxina hemorrágica
TRIS	-	Tris (hidroximetil)amino metano
U/mg	-	Unidades por miligrama
U.V.	-	Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fracionamento das toxinas hemorrágicas do veneno de *Bothrops cotiara*

Tabela 2 - Determinação da relação dose:atividade hemorrágica do veneno bruto de
Bothrops cotiara

Tabela 3 - Fracionamento das enzimas proteolíticas sobre a caseína do veneno de
Bothrops cotiara

Tabela 4 - Fracionamento das enzimas coagulantes "thrombin-like" do veneno de
Bothrops cotiara

Tabela 5 - Fracionamento da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara*

Tabela 6 - Atividade de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara* sobre
diferentes substratos

Tabela 7 - Sumário dos procedimentos de fracionamento por permeação em gel e por
cromatografia de troca iônica, do veneno de *Bothrops cotiara*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops cotiara* fracionado por cromatografia em gel de Sephadex G-100
- Figura 2 - Padrões de peso molecular na coluna de Sephadex G-100
- Figura 3 - Cromatografia da fração hemorrágica TH-2 do veneno de *Bothrops cotiara*, em DEAE-celulose
- Figura 4 - Cromatografia da fração hemorrágica TH-3 do veneno de *Bothrops cotiara*, em DEAE-celulose
- Figura 5 - Atividade hemorrágica do veneno bruto de *Bothrops cotiara*
- Figura 6 - Determinação da relação dose:atividade hemorrágica do veneno bruto de *Bothrops cotiara*
- Figura 7 - Atividade caseinolítica do veneno de *Bothrops cotiara* fracionado por permeação em gel de Sephadex G-100
- Figura 8 - Cromatografia das enzimas proteolíticas contidas na fração 10-18 do Sephadex G-100, em DEAE-celulose
- Figura 9 - Atividade coagulante do veneno *Bothrops cotiara* fracionado por permeação em gel de Sephadex G-100
- Figura 10 - Atividade coagulante da fração 10-18 da permeação em gel de Sephadex G-100 do veneno de *Bothrops cotiara*, submetida a DEAE-celulose
- Figura 11 - Atividade coagulante da fração 19-26 da permeação em gel de Sephadex G-100 do veneno de *Bothrops cotiara*, submetida a DEAE-celulose

- Figura 12 - Atividade de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara* fracionado por permeação em gel de Sephadex G-100
- Figura 13 - DEAE-celulose da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara* contida na fração 10-18 do Sephadex G-100
- Figura 14 - DEAE-celulose da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara* contida na fração 19-26 do Sephadex G-100
- Figura 15 - Análise espectral do coenzima (FAD) da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara*
- Figura 16 - Isoeletrofocalização do veneno bruto de *Bothrops cotiara* e de suas frações cromatográficas
- Figura 17 - Zimograma da atividade de L-aminoácido oxidase, acoplada a isoeletrofocalização, do veneno bruto e das frações cromatográficas do veneno de *Bothrops cotiara*
- Figura 18 - Zimograma da atividade de L-aminoácido oxidase, acoplada a isoeletrofocalização, do veneno bruto de *Bothrops cotiara* sobre L-serina, L-metionina e L-histidina
- Figura 19 - Cromatografia líquida de alta resolução (H.P.L.C.) do veneno bruto de *Bothrops cotiara*, em coluna de troca iônica DEAE 5PW
- Figura 20 - Cromatografia líquida de alta resolução (H.P.L.C.) do veneno bruto de *Bothrops cotiara*, em coluna de filtração em gel PROTEIN PAK 60
- Figura 21 - Eletroforese capilar do veneno bruto de *Bothrops cotiara*, sob diferentes condições

ABSTRACT

The known complex of bioactive compounds comprising snake venoms was particularly examined in the *Bothrops cotiara* venom.

Focus was set in the enzymatic activities closely related to the tissue damage following venom inoculation, such as hemorrhagins, proteases, and L-amino acid oxidases activities.

The *Bothrops cotiara* venom was submitted to fractionation by gel-permeation in Sephadex G-100 and ion-exchange chromatography in DEAE-cellulose, and the results were:

a) nine hemorrhagic fractions, the most active being found within the middle molecular weight (TH-3) and middle acidic charge protein subpopulation (TH-b). The zinc ion was confirmed as co-factor of these metaloproteinases.

b) eight proteolytic fractions measured with casein, and among them, the highest purification factor (6.67) simply resulted from gel permeation as the component (s) of the highest molecular weight range (PC-1).

c) nine thrombin-like fractions whose features displayed relatively high molecular weight (AC-1) and middle acidity (AC-c and AC-d). The maximum enrichment obtained (CI=41.7) by far exceeded the basal activity of the crude venom (CI=7.7).

d) twelve fractions for L-amino acid oxidases (LAO) resulted from combined gel permeation and ionic exchange. A remarkable resolution for the whole isoenzymes was obtained by polyacrilamide gel isoelectrofocusing (PAGE-IEF) coupled to LAO zymogram using L-methionine or L-leucine as substrates. This enzymatic profile, a pionner research in *Bothrops cotiara* venom, consisted up to eighteen LAO bands amongst thirty six protein bands. FAD (flavin adenin dinucleotide) was confirmed as the enzymatic cofactor for LAO(s).

The microheterogenity of *Bothrops cotiara* venom proteins was also assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) and by high voltage capillary electrophoresis (CE).

RESUMO

A composição de venenos de serpentes como sendo mistura complexa de enzimas e de compostos não-enzimáticos, com diferentes atividades biológicas, foi confirmada para o veneno de *Bothrops cotiara*.

Os efeitos locais decorrentes de um envenenamento por serpentes, como hemorragia e necrose estão, de alguma forma, relacionados com enzimas proteolíticas, as quais complementadas pelas L-aminoácido oxidases, determinam a degradação das proteínas e boa parte de seus monômeros.

O veneno de *Bothrops cotiara* foi submetido a fracionamento por permeação em gel de Sephadex G-100 associada à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose.

Como resultado destas técnicas de fracionamento, foram obtidas:

a) nove frações hemorrágicas, sendo que dentre os componentes da fração de permeação de menor faixa de peso molecular (TH-3), o refracionamento por troca iônica permitiu recuperar na faixa de acidez média (TH-3b) a fração com maior atividade hemorrágica. O zinco (Zn^{2+}) foi confirmado como cofator destas metalo-proteinases.

b) oito frações proteolíticas sobre a caseína, sendo que o melhor fator de purificação (6.67) foi conseguido simplesmente por filtração em gel, na faixa mais elevada de peso molecular (PC-1).

c) nove frações coagulantes "thrombin-like", sendo que as sub-frações de média acidez da troca iônica (AC-c e AC-e), derivadas inicialmente da população protéica de maior peso molecular da filtração em gel (AC-1), localizaram os componentes mais efetivos (IC = 41.7) bem superior portanto à aquela verificada para o veneno bruto (IC = 7.7).

d) doze frações para L-aminoácido oxidase (LAO), por permeação em gel combinada com troca iônica, sendo que a sub-fração com a maior atividade encontrada, de pequeno conteúdo protéico (LAO-1c), foi mais sujeita a inativação enzimática se comparada com as demais. Uma maior resolução do conjunto de isoenzimas para LAO foi obtida com a metodologia de isoeletrofocalização em poliacrilamida (PAGE-IEF) acoplada ao zimograma, medido com L-metionina e L-leucina como substratos. Um perfil enzimático constituído de até 18 bandas para LAO sobre uma população protéica de 36 bandas foi, pioneiramente neste trabalho, encontrado no veneno de *Bothrops cotiara*. O FAD (flavina adenina dinucleotídeo) foi confirmado como coenzima do conjunto de LAOs.

O perfil protéico complexo do veneno de *Bothrops cotiara* foi igualmente confirmado através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e por eletroforese capilar de alta resolução (CE).

1. INTRODUÇÃO

Existe no mundo cerca de 2500 espécies de serpentes, das quais 400 venenosas para o homem, divididas em 5 famílias: *Colubridae*, *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophidae* e *Viperidae*. No Brasil, as mais importantes clinicamente são as famílias *Elapidae* e *Crotalidae*.

A família *Elapidae* encerra em torno da metade das serpentes venenosas, composta por 30 gêneros (BJARNASON & FOX, 1988). No Brasil, existe apenas um gênero de interesse médico, representado pelas corais: o gênero *Micrurus*. Estas serpentes são proteróglifas, ou seja, possuem presas anteriores fixas, com um sulco para a injeção do veneno, o qual é altamente neurotóxico e letal.

As serpentes da família *Crotalidae* são solenóglifas (presa anterior diferenciada e móvel), e possuem receptores diferenciais de temperatura entre o focinho e os olhos, denominados fosseta de loreau. Esta família contém a sub-família *Crotalinae*, com 3 gêneros de destaque: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*.

O gênero *Bothrops* é o mais abundante no Brasil, e causa também o maior número de acidentes ofídicos: cerca de 90% (O.M.S., 1981). Dentre os gêneros desta sub-família, é o que possui veneno menos letal (VITAL BRAZIL, 1901), mas causador de sérias lesões locais.

Os venenos de serpentes são misturas complexas de composição variável (proteínas, peptídeos, amins biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos, lipídeos e sais minerais), podendo ser formados por componentes enzimáticos e não-enzimáticos, de diferentes atividades biológicas. Algumas das enzimas presentes nos venenos são: L-aminoácido oxidase, fosfatase alcalina, fosfodiesterase, fosfolipase A₂, hialuronidase, 5'-nucleotidase e proteinases (FRANCIS e cols., 1992) entre outras, sendo a maioria metalo-dependentes. Num envenenamento, as principais atividades patológicas observadas podem ser divididas em locais (edema, hemorragia e necrose) e em

sistêmicas (alterações cardio-vasculares, desordens da coagulação, efeito citotóxico, hemólise, e efeito neurotóxico).

Haja vista o grande número de atividades encontradas nos venenos botrópicos, este estudo está orientado para focar basicamente duas atividades: uma biológica, representada pela atividade hemorrágica, e uma enzimática, representada pela atividade de L-aminoácido oxidase.

1.1. TOXINAS HEMORRÁGICAS

A importância da ação local dos venenos botrópicos tem sido ressaltada desde o início do século por VITAL BRAZIL (1901), sendo a hemorragia um dos sinais clínicos mais evidentes do envenenamento por serpentes *Crotalinae* (KOCHVA e cols., 1960; BOQUET, 1964; JIMÉNEZ-PORRAS, 1968; OHSAKA, 1979), além de serem também observados edema, degeneração muscular e necrose.

Estes efeitos locais não são eficientemente neutralizados pelo antiveneno, mesmo administrando-o imediatamente após o acidente (EICHBAUM, 1947; ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e cols., 1981, 1982 e 1985).

FLEXNER & NOGUCHI (1902) já observavam que os venenos de serpentes atuavam sobre as paredes dos vasos sanguíneos, causando extravasamento.

Com o edema e a hemorragia ocorre a formação de bolhas com substância sero-sanguinolenta, as quais podem evoluir para necrose e até perda do membro afetado (ROSENFELD, 1971).

Muitos autores correlacionavam diretamente os efeitos locais, como hemorragia, edema e necrose, com enzimas proteolíticas (HOUSSAY, 1930; KELLAWAY, 1939; ZELLER, 1948; PORGES, 1953; VAN HEYNINGEN, 1954; PHILIPOT & DEUTSCH, 1956; MAENO e cols., 1959 e 1960; IWANAGA e cols., 1965; TU, 1969). SLOTTA

(1955) considerava o sinergismo de proteases e fosfatases dos venenos *Crotalinae* como responsáveis pelo efeito hemorrágico, e KAISER & MICHL (1958) postulavam que a necrose e a hemorragia eram definidas por um único componente protéico.

Estes trabalhos, realizados com venenos brutos, normalmente acabavam por concluir que havia grande necessidade do desenvolvimento de metodologias de purificação dos princípios ativos, para um melhor e mais real entendimento dos mecanismos patogênicos da hemorragia.

Assim, os primeiros resultados de purificação dos princípios hemorrágicos, através de fracionamento eletroforético (OHSACA e cols., 1960a), e em CM-celulose (OHSACA, 1960), indicaram a ausência de relação entre necrose e hemorragia. Os mesmos autores observaram também a presença de pelos menos dois fatores hemorrágicos no veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, HR1 e HR2, ambos apresentando atividade proteolítica sobre a caseína.

Posteriormente, OHSACA e cols. (1960b), submetendo uma destas frações à isoeletroforese, observaram a presença de dois fatores hemorrágicos, distintos da fração com atividade proteolítica. Além disto, constataram que a atividade hemorrágica estava também desconectada da atividade miotóxica.

Trabalhando com o veneno de *Crotalus atrox*, PFLEIDERER & SUMIK (1961) obtiveram resultados diferentes, onde as proteases isoladas, e nominadas de proteases α , β e γ apresentavam também grande atividade hemorrágica.

Em 1962, com o objetivo de esclarecer a ligação entre as atividades letal, hemorrágica e proteolítica, MAENO pesquisou o veneno de *Trimeresurus flavoviridis*. Utilizando o método de KONDO e cols. (1960) para testar a atividade hemorrágica, ele detectou os mesmos princípios hemorrágicos, HR1 e HR2, separáveis por eletroforese (OHSACA e cols., 1960b), por cromatografia em CM-celulose (OHSACA, 1960), e que também seriam separadas mais tarde, por filtração em gel de Sephadex G-100 (OMORI-SATOH e cols., 1967). MAENO concluiu que a fração HR2, correspondendo a 50% da atividade hemorrágica do veneno bruto, era uma enzima proteolítica.

Ao isolar tres proteases do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, SATAKE e

cols.(1963) verificaram que uma delas, denominada **protease b**, possuía grande atividade hemorrágica. Em seguida, foram purificados do mesmo veneno dois fatores hemorrágicos (HR-I e HR-II), por OMORI e cols. (1964), os quais estavam relacionados com a atividade letal. A confirmação da relação entre a **protease b** e o fator HR-II foi determinada mais tarde, por IWANAGA e cols. (1965).

O isolamento das enzimas proteolíticas do veneno de *Bothrops jararaca* foi realizado por MANDELBAUM & HENRIQUES (1964), quando obtiveram a **Bothrops protease A** purificada. Sua especificidade de proteólise sobre a insulina foi determinada mais tarde, por MANDELBAUM e cols. (1967).

GROTTO e cols. (1967) reportaram a purificação de um fator hemorrágico do veneno de *Vipera palaestinae*, denominado "hemorragina", evidenciando a distinção entre as atividades hemorrágica e proteolítica do veneno. Esta hemorragina, uma proteína ácida com um peso molecular de 44 kDa, se mostrou homogênea por imunodifusão e ultracentrifugação analítica, mas ainda assim com atividade proteolítica sobre a gelatina, a qual era inibida pelo diisofluorpropilfosfato (DFP). O inibidor não alterava a atividade hemorrágica, sugerindo que a hemorragina e a protease eram entidades diferentes.

A **protease b** foi novamente investigada em 1968, por OSHIMA e cols., os quais purificaram e caracterizaram as suas propriedades físico-químicas: com peso molecular de 95 kDa, com pI de 4.8, e contendo 12.5% de ácido aspártico (teor maior do que para proteínas usuais) e em torno de 18% de carboidratos, novamente as atividades hemorrágica e proteolítica eram inseparáveis.

A atividade hemorrágica dos venenos de *Vipera aspis* e *Vipera russelli* foi investigada por TU e cols. (1969), desvinculando esta atividade das atividades mionecrótica e tóxica (letal); os autores já consideravam a atividade letal como a soma de efeitos das várias toxinas presentes nos venenos. Entretanto, mais uma vez a atividade hemorrágica estava relacionada com a atividade proteolítica sobre a caseína, TAME (N- α -p- tosil-L-arginina metil éster), e BAEE (N- α -benzoil-L-arginina etil éster).

Purificando e caracterizando algumas propriedades do princípio hemorrágico HR-2 do veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, TAKAHASHI & OHSAKA (1970 a, b)

desdobraram este princípio, por cromatografia em BIO-REX 70, em duas partes: HR2a e HR2b, ambas completamente separadas da atividade proteolítica, contrariando a conclusão de MAENO (1962) a respeito da HR2, citada anteriormente. Continuando o estudo dos princípios hemorrágicos deste veneno, OMORI-SATOH & OHSAKA (1970) purificaram a HR1, a qual possuía também relativa toxicidade letal ($DL_{50} = 4.63 \text{ ug/camundongo}$), e uma pequena atividade proteolítica sobre a caseína, considerada pelos autores como um contaminante.

A atividade hemorrágica do veneno de *Vipera palaestinae*, foi relatada novamente por McKAY e cols. (1970). Os autores observaram uma ação lítica direta da hemorragina sobre o endotélio dos capilares, com edema, extravasamento plasmático e escape de eritrócitos ao tecido conjuntivo. Já a fosfolipase A_2 purificada, não apresentou atividade lítica sobre o endotélio capilar.

Mais tarde, OSHIMA e cols. (1972) isolaram e estudaram o fator HR-I do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, com bom grau de homogeneidade, indicados pelo coeficiente de sedimentação, cromatografia em gel, eletroforese em gel de poliacrilamida e imunoeletroforese. Sendo uma glicoproteína ácida, com peso molecular de 85 kDa e pI de 4.7, o fator HR1 também mostrou um potente efeito letal ($DL_{50} = 0.36 \text{ mg/Kg}$), mas livre de atividade proteolítica ou demais atividades enzimáticas conhecidas no veneno (fosfolipase, fosfatase não específica, arginina-éster-hidrolase, liberadora de bradicinina, enzimas coagulantes, L-amino-ácido oxidase e hialuronidase). Uma comparação entre este fator e a **proteínase b** (HR-II), do mesmo veneno, isolada previamente por IWANAGA e cols. (1965), mostra muita semelhança em suas constantes físicas e composição química.

Em 1976, YAMAKAWA e cols. fracionaram o veneno de *Trimeresurus elegans*, obtendo três frações: S1, S2 e S3. A maior atividade hemorrágica foi encontrada na fração S2, a qual também foi a maior formadora de edema.

Dando origem a uma série de trabalhos realizados no estudo de fatores hemorrágicos de venenos de serpentes brasileiras, MANDELBAUM e cols. (1976) isolaram e caracterizaram dois fatores hemorrágicos do veneno de *Bothrops jararaca*:

HF-1 e HF-2. A fração HF-2, com um peso molecular de 50 kDa, continha uma atividade hemorrágica quase 5 vezes maior que a HF-1 e 66 vezes maior que o veneno bruto; continha também atividade proteolítica sobre a caseína, glucagon e cadeia β da insulina, as quais foram consideradas como parte do mesmo componente protéico HF-2, sugerido pela homogeneidade da fração sob vários critérios: eletroforese em gel de poliacrilamida, imuno-eletroforese e ultracentrifugação analítica.

Posteriormente, OVADIA (1978) isolou e caracterizou tres fatores hemorrágicos do veneno de *Vipera palaestinae*, denominados: HR1, HR2 e HR3. Os dois primeiros também mostraram atividade proteolítica sobre a gelatina e a caseína, enquanto o fator HR3 era desprovido destas atividades. O fator hemorrágico HR1 se mostrou fortemente ácido, o HR2 fracamente ácido, e o HR3 um fator hemorrágico básico com uma constituição glicoprotéica. Os tres fatores apresentaram pesos moleculares de 60 kDa, com a fração hemorrágica HR2 sendo a mais similar da hemorragina isolada por GROTTA e cols. (1967).

Cinco fatores hemorrágicos do veneno de *Crotalus atrox* foram isolados por BJARNASON & TU (1978), denominados toxinas hemorrágicas HT-*a*, -*b*, -*c*, -*d* e -*e*. Com pesos moleculares de 68 kDa para a HT-*a*, 24 kDa para a HT-*b*, HT-*c* e HT-*d* e de 25,7 kDa para a HT-*e*, todas foram verificadas como metaloproteinases zinco-dependentes. Tres delas foram detalhadamente estudadas com relação a patogenia da hemorragia, por auxílio de microscopia eletrônica (OWNBY e cols., 1978), e a constatação foi que todas induziram hemorragia pelo mesmo mecanismo que o veneno bruto: *per rhexis*. Além disto, a TH-*b* causou também mionecrose.

Tres hemorraginas, denominadas AaH-I, AaH-II e AaH-III, foram isoladas do veneno de *Agkistrodon acutus* por XU e cols. (1981), por cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, com posterior purificação por filtração em gel de Sephadex G-75 e recromatografia em DEAE-celulose e CM-Sephadex C-25. Todas as tres hemorraginas mostraram uma única banda na eletroforese em gel de poliacrilamida, mas imunologicamente diferentes entre si (imunodifusão). As hemorraginas AaH-I e AaH-II eram proteínas ácidas (pIs de 4.6 e 5.3, respectivamente), enquanto a AaH-III era básica

(pI > 9), mas todas com o mesmo peso molecular (22 kDa), apresentando atividade proteolítica sobre a caseína, e inibidas pelo EDTA, o que sugeriu serem metalo-dependentes. Além disto, as tres eram termo-lábeis e sensíveis a diminuição do pH. Somente a hemorragina AaH-III apresentava algum teor de carboidratos, como detectado pela reação de Antrona.

Do veneno de *Bitis arietans* também foi isolado um princípio hemorrágico, livre de atividades caseinásica e de hidrólise sobre éster de arginina, além de desvinculado com a propriedade letal do veneno (MEBS & PANHOLZER, 1982).

A **Bothropasina**, uma enzima proteolítica do veneno de *Bothrops jararaca*, foi isolada e caracterizada por MANDELBAUM e cols. (1982), livre de qualquer outra atividade. Com um peso molecular de 48 kDa, a enzima, ativa sobre a caseína, requeria íons Ca^{2+} para a sua estabilidade e maximização da sua atividade. Esta enzima se mostrou muito diferente da **Bothrops protease A**, mas com uma única diferença na hidrólise da cadeia β da insulina quando comparada com a HF-2 do mesmo veneno.

Dando prosseguimento ao estudo da enzima proteolítica **Bothrops protease A** do veneno de *Bothrops jararaca*, já isolada por MANDELBAUM & HENRIQUES (1964) e definido seu comportamento hidrolítico (MANDELBAUM e cols., 1967), REICHL e cols. (1983) descreveram suas propriedades físico-químicas e sua composição de aminoácidos. Possuindo peso molecular de 65 kDa e pI de 3.55, sua composição de aminoácidos mostrou altas proporções de ácido aspártico, ácido glutâmico e aminoácidos contendo enxofre, com um conteúdo diminuto de triptofano, tirosina e leucina. A hidrólise ácida mostrou que esta enzima era formada por 55% de proteínas e mais de 40% de carboidratos.

Do veneno de *Bothrops neuwiedii* também foram isolados e caracterizados dois fatores hemorrágicos (MANDELBAUM e cols., 1984), denominados NHFa e NHFb. Com pesos moleculares de 46 kDa e 58 kDa, respectivamente, ambas eram proteínas acídicas com pI de 4.2- 4.3, com o NHFb sendo 23 vezes mais hemorrágico que o NHFa. Em contrapartida, o NHFa hidrolizava 20 vezes mais a caseína do que o NHFb, apesar de ambos se apresentarem pouco proteolíticos. Por imunodifusão dupla estes dois fatores

hemorrágicos mostraram reatividade cruzada com o antiveneno espécie- específico, mas foram reconhecidos como dois componentes distintos pelo soro de coelho específico anti-hemorrágico.

NIKAI e cols. (1984) isolaram, do veneno de *Crotalus atrox*, um sexta toxina hemorrágica, adicional às cinco anteriormente isoladas por BJARNASON & TU (1978): a HT-f, a qual se mostrou homogênea por eletroforese em gel de poliacrilamida, nativa e com SDS, e isoeletrofocalização. Com um peso molecular de 64 kDa, também possuía atividade proteolítica, mas era desprovida de atividade coagulante. O íon Zn^{2+} era essencial para as suas atividades. A HT-f se mostrou imunologicamente diferente da HT-a e da HT-c, e causou hemorragia local e sistêmica.

A caracterização das toxinas hemorrágicas do veneno de *Trimeresurus gramineus* foi realizado por HUANG & LEE (1984). Os autores purificaram duas hemorraginas: HR1, uma α -proteinase com peso molecular de 23.500, e HR2, com peso molecular de 81.500. Ambas se mostraram como cadeias polipeptídicas únicas, mas com as atividades sendo completamente abolidas pelo β -mercaptoetanol, indicando que pontes dissulfeto eram essenciais para a atividade destas hemorraginas.

O veneno de *Bothrops moojeni*, conhecido pela sua alta atividade proteolítica, de fosfolipase A_2 e coagulante, e baixa atividade hemorrágica, foi objeto de estudo de ASSAKURA e cols. (1985), ocasião em que isolaram uma metaloprotease e reportaram suas propriedades físicas.

Duas toxinas hemorrágicas do veneno de *Bothrops asper*, BATH1 e BATH2, foram purificadas por HUDIBURG e cols. (1990): com pesos moleculares estimados de 30 kDa e 26 kDa, respectivamente, por filtração em gel de Sephadex G-100, e pesos moleculares de 30 kDa e de 17 kDa por SDS-PAGE, ambas eram ácidas.

O fracionamento do veneno de *Agkistrodon contortrix* (Johnson & Ownby, 1990) revelou pelo menos 6 toxinas hemorrágicas, em pequena quantidade (menos de 1% do total de proteínas), todas ácidas e com pesos moleculares variando entre 29 kDa e 46 kDa.

A purificação dos fatores hemorrágicos do veneno de *Lachesis muta muta*, LHF-I

e LHF-II, foi realizada por SÁNCHEZ e cols. (1987 e 1991). A LHF-I, com peso molecular de 100 kDa, mostrou baixa atividade proteolítica sobre a caseína e alta atividade hemorrágica, com grande especificidade por substratos específicos. Já a LHF-II, que apresentou baixa atividade hemorrágica e alta atividade proteolítica sobre a caseína, consistiu de uma única cadeia polipeptídica com peso molecular de 22.300 e pI de 6.6. Esta toxina também se mostrou estável num intervalo de pH entre 8 e 10, e termo-estável entre 20 e 40 °C por 15 minutos, perdendo a atividade gradualmente acima de 50 °C. A atividade proteolítica desta toxina hemorrágica foi afetada pela presença de cátions, sendo aumentada pelo Ca^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} e Mg^{2+} , e inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , apesar deste último elemento estar presente no veneno na concentração de 1 átomo grama/ mol de proteína, e o Ca^{2+} na concentração de 2 átomos grama/ mol de proteína, sendo portanto uma metalo-proteína como as outras toxinas hemorrágicas. A sequência completa de aminoácidos desta toxina (SÁNCHEZ e cols., 1991a), mostrou grande similaridade com as metaloproteínas hemorrágicas e não-hemorrágicas dos venenos de *Trimeresurus flavoviridis*, *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca*, com cerca de 35% dos resíduos de aminoácidos sendo conservados em todas estas proteínas; além disso, muitas das alterações envolveram substituições por aminoácidos de estrutura e carga parecidas. Cabe salientar, ainda, que das 7 posições onde os resíduos de cisteína tem sido encontrados, somente 4 são conservados em todas as proteínas.

O isolamento e a caracterização das toxinas hemorrágicas do veneno de *Bothrops asper* foi novamente conduzida por BORKOW e cols. (1993). Desta vez, tres toxinas hemorrágicas, definidas como BaH1, BaH2 e BaH3, foram caracterizadas: termo-lábeis (perda total da atividade à 60 °C por 15 minutos), sensíveis a valores extremos de pH (estáveis entre 5.5 e 9.5), com pesos moleculares respectivos de 64, 26 e 55 kDa, e com pIs respectivos de 4.5, 5.5 e 5. Foi também observado que após a termo-labilidade, as toxinas formavam linhas de precipitação com o antiveneno (em imunodifusão), indicando que a imunogenicidade fora mantida. Além disto, estas frações não eram inibidas por inibidores de proteinases, como PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) e inibidor de tripsina de soja, mas foram inibidas por inibidores de metaloproteinases, como o

ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) e a *o*-fenantrolina. Também foi observado um efeito sinérgico entre as toxinas hemorrágicas, já que sozinhas, e na dose de 0.25 DMH, as frações BaH2 e BaH3 quase não manifestaram hemorragia, ao passo que ao serem somadas com a BaH1, a hemorragia observada era de 1 DMH. Esta atividade poderia explicar o aparecimento de muitas toxinas hemorrágicas em venenos de serpentes, as quais podem atuar em diferentes substratos e aumentar o efeito hemorrágico final (BORKOW e cols., 1993).

1.1.a. MECANISMO DE AÇÃO DAS TOXINAS HEMORRÁGICAS

Apesar de todos os trabalhos realizados até então, o mecanismo de ação das toxinas hemorrágicas permanece sem resposta, apenas com algumas etapas já desvendadas e outras hipóteses formuladas.

Estudando a ação dos fatores hemorrágicos purificados do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* sobre a membrana basal de glomérulo isolado, OHSAKA e cols. (1973) demonstraram que muitas destas toxinas causavam liberação de proteínas e carboidratos.

Muitos fatores hemorrágicos isolados de venenos da sub-família *Crotalinae* são proteases (TU, 1982), e segundo BJARNASON & FOX (1988/89), as toxinas hemorrágicas são enzimas proteolíticas sobre algum substrato protéico, já que em trabalho prévio (BJARNASON e cols., 1988) todas as toxinas hemorrágicas testadas liberaram peptídeos solúveis de uma preparação de membrana basal de rim de rato.

Esta atividade de proteólise pode ser relevante ao processo de dano capilar, pois muitas toxinas hemorrágicas degradam colágeno (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989), um dos componentes da membrana basal dos capilares, a qual parece ser um dos principais sítios de ação das toxinas hemorrágicas (BJARNASON & FOX, 1988/89). A membrana basal é composta por uma série de proteínas, entre elas: laminina,

proteoglicanas de sulfato de heparina, fibronectina, colágeno tipo IV, nidógeno, pequenas quantidades de colágeno tipo V e outras proteínas ainda não caracterizadas (KLEINMAN e cols., 1986).

As toxinas hemorrágicas podem clivar uma ou mais destas proteínas (BJANARSON e cols., 1988). Este mesmo grupo de pesquisadores, numa série de trabalhos com as toxinas hemorrágicas do veneno de *Crotalus atrox*, verificaram que todas elas digeriam as cadeias de laminina e de nidógeno, e que o colágeno tipo IV era digerido para fragmentos discretos. Os colágenos I, III e V não eram degradados. A ruptura destes componentes da matriz poderiam expor as células endoteliais dos capilares ao ambiente, com conseqüente extravasamento para os tecidos (BJARNASON & FOX, 1988/89). Os aminoácidos por ventura liberados seriam, então, degradados aos respectivos ceto-ácidos pela ação da L-aminoácido oxidase.

Comparando as atividades e os efeitos da HF-2 e da **Bothropasina**, do veneno de *Bothrops jararaca*, QUEIROZ e cols. (1985) concluíram que os fatores hemorrágicos podem contribuir mais do que as proteases para a hemorragia nos envenenamentos por esta espécie de serpente.

Esta relação da atividade proteolítica com a patogenia hemorrágica foi discutida por GONÇALVES (1993). Alguns fatores hemorrágicos possuem potente atividade proteolítica mas que, segundo o autor, isoladamente não seria o suficiente para justificar a patogenia da lesão hemorrágica. O envolvimento de fatores endógenos também estariam contribuindo para o fenômeno hemorrágico, fato comprovado pelo experimento por ele realizado com o veneno de *Bothrops jararaca*, injetado subcutaneamente em ratos, logo após parada cardiorespiratória: o tecido conjuntivo se manteve organizado, com os mastócitos apresentando seus grânulos intactos, contra o inverso para o controle.

A participação de alguns mediadores endógenos na patogenia da hemorragia local, induzida pelo mesmo veneno, também foi estudada, e os derivados do ácido araquidônico, envolvidos na mediação do edema, aparentemente não participaram da hemorragia, sugerido pelo fato de animais tratados com indometacina e com dexametasona apresentarem hemorragia como os controles, indicando inclusive que as

mediações são distintas (GONÇALVES, 1993).

O envolvimento de mediadores neurogênicos também ficou fortemente sugerido pelos tratamentos com morfina, guanetidina e denervação crônica, os quais diminuíram significativamente a hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*. Com isto, a participação da substância P na patogenia hemorrágica não pode ser descartada, tanto por ser parcialmente inibida por bloqueadores de receptores opióides e depletada por denervação crônica, quanto por induzir a degranulação de mastócitos (GONÇALVES, 1993).

De forma geral, as toxinas hemorrágicas podem induzir hemorragia de duas formas: *per rhexis*, onde o endotélio capilar é rompido, com conseqüente escape de eritrócitos e esperada agregação plaquetária nos vasos danificados, especialmente no sítio da ruptura endotelial (OWNBY e cols., 1974 e 1978), além de um efeito citotóxico direto nas células endoteliais (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; LOMONTE, 1994); e *per diapedesis*, onde os eritrócitos escapam por junções intercelulares entre as células endoteliais dos capilares, sem rompimento celular (OHSAKA e cols., 1973).

1.2. L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO)

A remoção de grupos amino dos aminoácidos pode ocorrer basicamente por: transaminação, transamidação, desaminação direta, desaminação por desidratação, desaminação hidrolítica e desaminação oxidativa (BEITZ & ALLEN, 1988).

Várias enzimas que catalizam a desaminação oxidativa de aminoácidos têm sido encontradas em microrganismos, répteis e mamíferos (WELLNER & MEISTER, 1960).

A L-aminoácido oxidase (L-aminoácido: oxigênio oxidoreductase), E. C. 1.4.3.2., catalisa a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, de acordo com a reação a seguir,

hipertensinase do veneno de *Bothrops neuwiedi* com a atividade de LAO deste veneno, mas concluiu que a atividade de hipertensinase mostrada na mesma preparação de LAO, usada por BLANCHARD e cols. (1944), estava associada com uma contaminação, e que a atividade de hipertensinase estaria relacionada à presença de um agente proteolítico.

Baseado nos resultados obtidos até então, ZELLER (1948) teceu algumas considerações a respeito da LAO de venenos de serpentes: que ela preferia aminoácidos com 5 átomos de carbono, e que este deveria possuir um α -amino grupo não substituído, além de um grupo carbonila livre e um radical orgânico; que era inibida por ácidos carboxílicos, como o benzóico, salicílico e mandílico, e por sulfonamidas; e que, diferentemente da LAO de rim de rato, a LAO de serpentes não sofria interferência da amônia, era inibida por alta concentração de substrato, não era sensível a diluições, e desaminava L-valina preferencialmente a L-alanina. Também mostrou as condições ótimas para a enzima: tampão fosfato 0.15 M, pH 7.2, temperatura de 38 °C e uma concentração final de L-leucina de 0.007 M.

Estudando a LAO dos venenos de *Crotalus adamanteus* e de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, WELLNER & MEISTER (1960) mostraram que após purificação cromatográfica, a enzima apresentou uma atividade de 4000 U/mg. Também foi verificado que a LAO é termo-protegida pela L-leucina, L-fenilalanina e L-metionina (10 μ moles/10 mg de veneno) ou ditionito de sódio (2.9 μ moles), já que a enzima em solução, sem nenhum destes protetores, ao ser aquecida, se tornava amarelada e sem atividade, e "protegida" por uma destas substâncias, ao ser aquecida, permanecia branca e mantinha a atividade. Os autores verificaram, ainda, que o pH ótimo para a enzima de ambas espécies era 7.5, que o peso molecular estava em torno de 130 kDa, com 2 moles de FAD por mol de enzima, e que a forma cristalina mostrou até 3 componentes quando submetida a eletroforese, com igual atividade entre elas.

Mais tarde, KORNALIK & MASTER (1964), examinando comparativamente as atividades de venenos amarelos e brancos de *Vipera ammodytes*, verificaram que estes venenos não diferiam para as atividades: coagulante, triptica, de gelatinase, fibrinolítica, de fosfolipase A₂, de fosfo-mono e -diesterase e de toxicidade, mas a atividade da LAO

foi 200 vezes maior no veneno amarelo. Além disto, verificaram que o veneno branco, quando incubado com FAD ou outros compostos de flavina, não aumentava sua atividade.

Um novo estudo da LAO de *Crotalus adamanteus*, por CURTI e cols. (1968), concluiu que a enzima perde sua atividade pelo congelamento (de -5 à -60 °C), com perda máxima de atividade à -20 °C, perda segundo os autores associada ao desacoplamento do FAD, por uma mudança conformacional limitada, particularmente na proximidade da coenzima. Esta perda era reversível, com recuperação da atividade após diálise contra tampão acetato 0.1 M pH 5 e reaquecimento da amostra à 38 °C/ 1 hora (ou $\Delta H = 40$ kcal/mol). A inativação pelo calor pôde ser parcialmente protegida por ânions monovalentes, e o espectro de absorção da enzima apresentou picos máximos em 390 e 492 nm.

A atividade de LAO, entre outras atividades, dos venenos de *Vipera*, foi determinada por TAN & PONNUDURAI (1990). Estes venenos exibiram níveis variáveis de atividade, de acordo com a espécie, e mesmo variações individuais foram observadas. O mesmo trabalho foi realizado com alguns venenos botrópicos (TAN & PONNUDURAI, 1991), sendo que todos eles expressaram alguma atividade entre 11 nmol/min/mg de proteína (*Bothrops alternatus*) e 709 nmol/min/mg de proteína (*Bothrops schlegeli*), com uma variação individual extremamente alta, de até cinco vezes, como em *Bothrops jararaca*.

Baseado na observação de SKARNES (1970), de uma atividade antibacteriana da LAO purificada de *Crotalus adamanteus*, recentemente STILES e cols. (1991) relacionaram a atividade bacteriana encontrada em alguns venenos com a atividade de LAO, principalmente devido as duas enzimas purificadas de *Pseudechis australis*, LAO-1 e LAO-2. A atividade de ambas foi determinada com sensor de oxigênio, sendo que a LAO-1 mostrou uma atividade 2 vezes maior que a LAO-2, além de expressar uma atividade antibacteriana consistentemente maior. O peso molecular de ambas (142 kDa) foi similar ao encontrado para a LAO de *Crotalus adamanteus*, de 140 (DEVOK & RAWITCH, 1969) e de 130 kDa (WELLNER & MEISTER, 1960).

A especificidade de substrato da LAO de *Ophiophagus hannah* foi verificada por TAN & SAIFUDDIN (1991). A enzima, purificada por filtração em gel de Sephadex G-200, seguida por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel, e novamente em Sephadex G-200, se mostrou homogênea em PAGE à pH 8.3 e SDS-PAGE. A oxidação catalítica seguiu a cinética de Michaelis & Menten à 25 °C, com evidente inibição por altas concentrações de substrato, e sofrendo grande efeito do pH sobre os parâmetros cinéticos da oxidação da L-leucina e da L-lisina. A L-leucina foi um bom substrato à pH 6, enquanto a L-lisina foi bom substrato apenas em pH acima de 7.5. A concentração ótima de substrato também variou, quando testados no mesmo pH e temperatura: de 0.06 mM para a L-tirosina, 0.3 mM para a L-leucina, até 162 mM para a L-alanina. A constante de especificidade (K_{cat}/K_m) para os substratos também variou muito, e usando-a como critério, a enzima foi mais ativa contra L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina e L-triptofano.

Caracterizada por SÁNCHEZ & MAGALHÃES (1991) como uma glicoproteína de peso molecular de 138 kDa e pI de 5.2, a LAO do veneno de *Lachesis muta muta* apresentou absorvância máxima em 389 e 460 nm, com 2 moles de FAD por mol de proteína. A enzima se mostrou homogênea por PAGE a pH 8.5, imunoeletroforese, imunodifusão e isoeletrofocalização. O resultado da SDS-PAGE resultou num peso molecular de 68 kDa, sugerindo que a enzima é um dímero. A atividade específica desta LAO foi 44.4 U/mg, usando 7.5 mM de L-leucina como substrato e *o*-dianisidina como doador de elétrons, à pH 7.6 e 25 °C.

A LAO do veneno de *Naja naja kaouthia* foi purificada e caracterizada por TAN & SWAMINATHAN (1992). O peso molecular da enzima foi de 112 kDa, determinado em Sephadex G-200, e 57.400 como determinado por SDS-PAGE, indicando ser um dímero de duas sub-unidades. Com pI de 8.2 e pH ótimo de 8.5, esta enzima se mostrou termo-estável e estável em meio alcalino. Sua maior atividade foi contra L-fenilalanina e L-tirosina, e estudos cinéticos sugeriram a presença de um sítio de ligação de cadeia lateral na enzima, compreendido por pelo menos 4 sub-sítios hidrofóbicos.

A reatividade cruzada de 4 componentes do veneno de *Ophiophagus hannah* foi

examinada por ELISA indireto e duplo sanduíche (TAN e cols., 1993). Os anticorpos para a LAO deste veneno produziram reação cruzada indireta com muitos venenos (crotalídeos inclusive), assim como com a neurotoxina, com a fosfolipase A₂ e com a toxina hemorrágica, sugerindo que esta LAO divide epítomos comuns com proteínas não relacionadas, o inverso do que ocorreu com a toxina hemorrágica deste mesmo veneno, o qual não reagiu com nenhum dos venenos testados, indicando ser antigenicamente muito distinto das toxinas hemorrágicas de outros venenos.

1.2.a. APLICAÇÕES DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE

Atualmente, a principal aplicação da LAO está sendo como técnica de rotina para a remoção de L-aminoácidos livres do plasma, com o objetivo de se estimar quantitativamente o ácido δ -aminolevulínico (ALA) em casos de porfírias congênitas e provocadas pela AIDS, saturnismo e tirosinemia (HERMES-LIMA, 1990).

Uma outra aplicação se refere a um sistema de biosensor desenvolvido para a determinação do adoçante artificial Aspartame (L-aspartil-L-fenilalanina metil éster). O sistema combina uma coluna de pronase imobilizada em esferas de vidro arilamida, formando uma coluna de enzima, com a LAO imobilizada numa membrana de nylon pré-ativada e presa na ponta de um eletrodo de peróxido de hidrogênio; a fonte de LAO é o veneno de *Crotalus adamanteus* (MALE e cols., 1993).

Ainda, um eletrodo de LAO imobilizada numa membrana de poliamida tem sido utilizada para a determinação de L-aminoácidos em análises clínicas, indústrias alimentícias e tecnologia de fermentações (RODU & COULET, 1993).

Dentre os venenos animais testados por TAN & PONNUDURAI (1992), os únicos que apresentaram atividade de LAO foram os de serpentes; desta forma, estes venenos se tornam uma importante opção como fonte desta enzima.

Desta forma, a caracterização bioquímica das toxinas hemorrágicas e das isoenzimas de L-aminoácido oxidase presentes no veneno da serpente *Bothrops cotiara*, uma espécie nativa dos estados do Paraná e de Santa Catarina (de florestas de araucária), como exemplos respectivos de uma atividade biológica e de uma atividade enzimática, podem contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação das toxinas hemorrágicas, além de elucidar a possível relação de ambas atividades.

2. OBJETIVOS

Com base nos questionamentos levantados na introdução, o presente trabalho de tese teve por objetivos:

1. Fracionar e purificar os componentes bioativos do veneno de *Bothrops cotiara*, através de metodologias como filtração em gel e cromatografia de troca iônica;
2. Monitorar as frações obtidas para atividades enzimáticas (caseinolítica, coagulante e de L-aminoácido oxidase) e para atividade biológica (hemorrágica), tendo em vista a possível relação entre elas;
3. Realizar cromatografia líquida de alta resolução e eletroforese capilar do veneno bruto, com o intuito de compará-las com os perfis obtidos através dos processos cromatográficos clássicos de filtração em gel e troca iônica;
4. Caracterizar o veneno bruto de *Bothrops cotiara* através de isoeletrofocalização acoplada a zimograma de L-aminoácido oxidases desenvolvido com diferentes substratos.

3. JUSTIFICATIVAS

Estudos sobre venenos vêm sendo realizados há muitos anos, basicamente por duas áreas distintas: o de produção e o de pesquisa. A primeira área utiliza o veneno como antígeno para a produção do antiveneno, atualmente o único tratamento específico para acidentes ofídicos.

A área de pesquisa engloba tres aspectos: o primeiro a ser considerado é o próprio veneno, ou seja, sua composição, suas reações bioquímicas, o quanto seus componentes agem e por quais mecanismos de ação.

Baseado nestes mecanismos de ação se fundamenta o segundo aspecto, que é a descoberta de drogas (frações do veneno ou substâncias similares). Como exemplo têm-se a **Defibrase**, extraída do veneno de *Bothrops moojeni*, a **Reptilase**, do veneno de *Bothrops atrox*, e o **Arvin**, de *Calloselasma rhodostoma*, todos trombolíticos produzidos pela PENTAPHARM LTD., Switzerland.

O terceiro aspecto é o uso de substâncias do veneno (frações) para a descoberta e/ou investigação de sistemas fisiológicos. Como exemplo têm-se dois casos dignos de citação: a cascata de coagulação sanguínea foi desvendada e estruturada por EAGLE (1937), o qual pesquisava venenos de ofídios e verificou que eles atuavam na coagulação sanguínea. Outro exemplo foi quando ROCHA E SILVA e cols. (1949), estudando o veneno de *Bothrops jararaca*, verificaram um efeito hipotensor e bradicárdico. A pesquisa os conduziu ao descobrimento de que estes sinais eram decorrentes da liberação de um autofármaco, denominado por eles de "bradicinina", se revelando então todo o sistema de cininas.

Os processos de fracionamento e purificação de venenos de serpentes podem contribuir para o esclarecimento da patogenia da atividade hemorrágica dos venenos botrópicos, o que é de vital importância, já que representam em torno de 90% dos

acidentes ofídicos no Brasil.

Além disto, o estudo da atividade de LAO de um veneno botrópico poderá contribuir para a tecnologia de manufatura de eletrodos para biosensores.

A escolha do veneno da serpente *Bothrops cotiara*, nativa dos estados do Paraná e Santa Catarina, também deve-se ao fato de que esta espécie encontra-se ameaçada de extinção. Mais uma razão para o interesse no referido veneno, que deverá se tornar extremamente raro em pouco tempo, se nenhuma medida preventiva à extinção da espécie for tomada imediatamente.

4. MATERIAIS

4.1. OBTENÇÃO DO VENENO

A amostra de veneno de *Bothrops cotiara* foi proveniente do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e teve origem de um "pool" de várias serpentes e extrações, com subsequente secagem à vácuo e armazenamento à -20 °C (Normas da Seção de Venenos do Instituto Butantan).

4.2. ANIMAIS

Para os experimentos de determinação de atividade hemorrágica, foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus*), linhagem Swiss Webster, de ambos os sexos, pesando de 18 a 22 gr., procedentes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.3. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos necessários para o desenvolvimento dos trabalhos propostos foram os seguintes:

- Sistema de eletroforese em acetato de celulose
- Sistema de eletroforese em gel (PROTEAN II, Biorad)
- Sistema de eletroforese capilar (QUANTA 4000 CE, Waters), USP - São Carlos
- Centrífuga refrigerada (HIMAC, Hitachi)
- Sistema de liofilização (LABCONCO, Edwards)
- Centrífuga a vácuo (SPEED VAC SC 100, Savant)
- Câmara refrigerada com circulação (Tecnal) - Colunas para filtração em gel (vários tamanhos)
- Sistema de isoeletrofocalização analítica (BUCHLER, Labconco) e preparativa (8100 TYPE 110 ml, LKB)
- pHmetro (B274, Micronal)
- Sistema de cromatografia líquida de alta resolução (WATERS, Millipore), em aparelho modular com detector de UV e aplicação da fase DEAE 5PW e da fase Protein Pak 60
- Coletor de frações (Gilson)
- Espectrofotômetro (DMS-80, Intralab)
- Espectrofotômetro de absorção atômica (A 7000 SBC, CG Analítica Ltda.)

4.4. SUBSTRATOS

Caseína (tipo Hammastern) da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A. Fibrinogênio bovino, purificado pelo método de BENSON (1972), pelo Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, São Paulo. L-leucina e L-arginina da RIEDEL-DE HAEN AG, Seelze, Hannover. Os outros aminoácidos, da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A. Peróxido de Hidrogênio 3%, da CASA GRANADO Laboratórios.

4.5. ENZIMAS

L-aminoácido oxidase de *Crotalus atrox* e de *Bothrops atrox*, e peroxidase, ambas da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A.

4.6. MATERIAIS PARA ELETROFORESE E CROMATOGRAFIA

Acrilamida, da BIO-RAD, Califórnia, U.S.A. N,N'-metilenobisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e Persulfato de amônio, da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A. Agarose, da FUNBEC-CNPq-FINEP, Central de Drogas, Brasil. Sephadex G-100, da PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Suécia. DEAE-celulose, da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A.

4.7. OUTROS MATERIAIS

Albumina de Soro Bovino, fração V, da FUNBEC-CNPq-FINEP, Central de Drogas. Acido tri-cloro-acético, da VETEC QUIMICA FINA LTDA., Brasil. Azul de bromofenol, Azul de *Coomassie* G-250, da SIGMA CHEMICAL CO., U.S.A. Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

5. MÉTODOS

5.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para a dosagem de proteínas foi utilizado o método de BRADFORD (1976), e alternativamente outros métodos descritos, como o de LOWRY e cols. (1951), usando a soro albumina bovina como padrão, ou por medida espectrofotométrica direta da absorbância à 280 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm.

5.2. PREPARAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

5.2.1. GEL DE SEPHADEX

Como primeira técnica de separação e purificação das proteínas do veneno de *Bothrops cotiara*, se utilizou filtração em gel Sephadex G-100 (matriz de dextran), preparado de acordo com as especificações do fabricante, sendo observado os cuidados necessários para a obtenção de um leito homogêneo e uniformemente empacotado. Previamente ao uso, a coluna (2.5 x 60 cm) foi equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 7.5, contendo 1 mM de CaCl_2 , e o volume morto (V_0) verificado com *Blue Dextran* 2000. Frações de 3.5 ml/tubo foram coletadas à uma velocidade de fluxo de 20 ml/hora, sob refrigeração (4 °C).

5.2.2. DEAE-CELULOSE

Para a cromatografia em resina de troca iônica, se utilizou uma coluna de DEAE-celulose, de 3 x 35 cm, preparada de acordo com NEUKOM & KUEDING (1962), equilibrada previamente com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5, contendo 1 mM de CaCl_2 , e eluída com um gradiente operado de 0 à 0.5 M de cloreto de sódio. Amostras de 3 ml por tubo foram coletadas à uma velocidade de fluxo de 18 ml/hora, sob refrigeração à 4°C.

5.2.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)

As fases de troca iônica (DEAE 5PW), de 7.5 mm x 7.5 cm, e de filtração em gel (PROTEIN PAK 60), de 7.8 mm x 30 cm e com intervalo de fracionamento para pesos moleculares entre 1.000 e 20.000 Da, foram montadas no equipamento segundo as recomendações do fabricante, e equilibradas previamente ao uso com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5, sendo que para a troca iônica foi realizado gradiente de cloreto de sódio (0- 500 mM). A amostra do veneno de *Bothrops cotiara*, na concentração de 10 mg/ml do mesmo tampão de equilíbrio, e previamente filtrada, foi eluída à uma velocidade de fluxo de 1 ml por minuto para a troca iônica e 0.75 ml por minuto para a filtração em gel, e com uma pressão de 420 e 550 psi, respectivamente.

5.3. ISOELETROFOCALIZAÇÃO

As técnicas de isoeletrofocalização foram seguidas como descritas por GRABAR & WILLIAMS (1953 e 1955) e por ANDREWS (1987).

As soluções de veneno bruto e das frações purificadas de interesse, foram aplicadas, na concentração de 80 mg/ml de NaCl 0.09%, no meio de uma placa de gel de poliacrilamida Ampholine para uma variação de pI entre 3.5 e 9.5 (Pharmacia, Uppsala, Suécia). As soluções de eletrólitos foram ácido fosfórico 1M para o ânodo e hidróxido de sódio 1 M para o cátodo, e as condições iniciais de corrida foram 150 volts, 8 mA e 1 watt. Após 3.5 horas, a voltagem foi aumentada para 450-500 volts até uma queda final da corrente para 0.3 mA. O gel foi então fixado com TCA 11.6% e ácido sulfosalicílico 3.4%, corado com azul brilhante de *Coomassie* R-250 em metanol: ácido acético: água (50: 7: 43), e descorado em seguida por uma solução de 1-propanol: metanol: ácido acético: água (50: 50: 50: 100).

5.3.1. ZIMOGRAMA

Para a realização do zimograma, metade do gel da isoeletroforese foi cortado e submergido num sistema de reação para a atividade de LAO, durante 10-20 minutos à temperatura ambiente, se utilizando a *o*-dianisidina como agente acoplador, num sistema de incubação segundo HUGGETT & NIXON (1957).

5.4. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A CASEÍNA

A atividade proteolítica sobre a caseína foi estimada pelo método de KUNITZ (1947), modificado por LOMONTE & GUTIÉRREZ (1983).

Foram incubados, à 37 °C por 30 minutos, 1 ml de uma solução de caseína 1% em tampão Söerensen 0.1 M pH 7.6 com 1 ml de solução de veneno bruto (ou de fração cromatográfica), contendo entre 10 e 50 μ g de proteína.

A reação foi então parada com 3 ml de ácido tricloro-acético (TCA) 5%, as

soluções mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas à 3000 r.p.m. por 10 minutos, e a absorbância dos sobrenadantes determinadas, empregando comprimento de onda de 280 nm. O branco, ao invés de solução de veneno, continha apenas solução fisiológica.

Os procedimentos foram realizados em duplicata.

O resultado foi expresso em Índice de Proteólise (I.P.), obtido da equação: $IP = (D.O.280 \text{ nm} \times 100) / \text{mg de proteína}$ (LEITE e cols., 1992).

5.5. ATIVIDADE COAGULANTE "THROMBIN-LIKE"

Para a verificação desta atividade foi usada a metodologia de THEAKSTON & REID (1983), com algumas modificações: foi adicionado, sobre 400 μl de solução de fibrinogênio (2 mg/ml), à 37 °C, 100 μl de solução de veneno bruto (ou de fração cromatográfica), contendo em torno de 20 μg de proteína, com rápida homogenização, e o tempo para a formação do coágulo cronometrado. Este procedimento foi realizado em duplicata, ou triplicata quando necessário.

A atividade coagulante foi expressa em Índice de Coagulação (IC), que é o inverso do tempo de coagulação da solução acima, multiplicado por 100 (LEITE e cols., 1992).

5.6. ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Para a avaliação da atividade hemorrágica, se utilizou o método proposto por KONDO e cols. (1960), modificada por GUTIÉRREZ e cols. (1985), através de uma injeção intra-dérmica de 0.1 ml de solução de veneno bruto (ou de fração

cromatográfica), contendo de 5 à 20 μg de proteína. Após um período de 2 horas, os camundongos foram eutanaziados com clorofórmio, e a área da lesão hemorrágica foi medida.

O resultado foi expresso em Atividade Hemorrágica Específica (AHE), definida como a área hemorrágica causada (em cm^2) por mg de proteína.

5.7. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE

Esta atividade enzimática foi realizada medindo-se o peróxido de hidrogênio gerado por consequência da desaminação oxidativa da L-leucina, como descrito por AISAKA & TERADA (1981). O sistema de incubação foi composto por 2 mM de substrato (L- leucina ou outro aminoácido quando especificado), 16 mM pH 7.5 de Tris-HCl, 0.04 mM de 4-aminoantipirina, 0.7 mM de fenol, 5 unidades de peroxidase, e enzima (em torno de 5 μg de veneno bruto ou de fração cromatográfica, num volume de 100 μl), num volume total de 3 ml. Após incubação à 37 °C por 20 minutos, a absorbância do corante formado (quinoneimina) foi medido em 500 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 nmol de peróxido de hidrogênio por minuto. A curva padrão de peróxido de hidrogênio, previamente titulado segundo JEFFERY (1984), foi realizada utilizando-se soluções de concentrações entre 8.3 e 166.8 μmoles de substrato para a peroxidase.

5.8. ANÁLISE ESPECTRAL DA COENZIMA

O espectro da coenzima da LAO, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), na concentração de 4.2 mM em tampão fosfato 0.1 M pH 7.0, foi registrado considerando-se

a sua característica de multibandas à 263, 375 e 450 nm (Dawson e cols., 1991). Para isto, uma solução do veneno de *Bothrops cotiara* (10 mg/ml) foi analisada com um rastreamento espectral de 100 nm por minuto e velocidade gráfica de 2 cm por minuto, e comparada com uma solução de FAD.

5.9. ANÁLISE DE ZINCO

Para a determinação do teor do elemento zinco no veneno bruto, foi utilizado espectrofotometria de absorção atômica em chama, em equipamento CGAA 7000 SBC (CG Analítica Ltda). A amostra de veneno utilizada foi na concentração de 1 mg/ml de tampão fosfato 0.1M pH 7.0 em água bidestilada.

5.10. ELETROFORESE CAPILAR

O perfil eletroforético do veneno bruto de *Bothrops cotiara* foi obtido em aparelho Quanta 4.000 da Waters, com filtro detector para absorbância de 240 nm, utilizando-se diferença de potencial entre 10 e 24 kV, gerando assim correntes entre 25 e 85 μ A, pelo tempo de 40 minutos. O veneno foi solubilizado em tampão fosfato 0.1M ou tampão citrato 0.02M pH 3.9.

6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

O esquema geral de fracionamento dos componentes bioativos do veneno de *Bothrops cotiara* constou a princípio das etapas de permeação em gel e de cromatografia de troca iônica. O veneno bruto e as frações foram analisados para as atividades hemorrágica, proteolítica sobre a caseína, coagulante e de L-aminoácido oxidase. Outras análises mais sofisticadas, como cromatografia líquida de alta resolução, isoeletrofocalização e eletroforese capilar, também foram realizadas para evidenciar o número de componentes no referido veneno.

6.1. FRACIONAMENTO DAS TOXINAS HEMORRÁGICAS DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

6.1.A. PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100

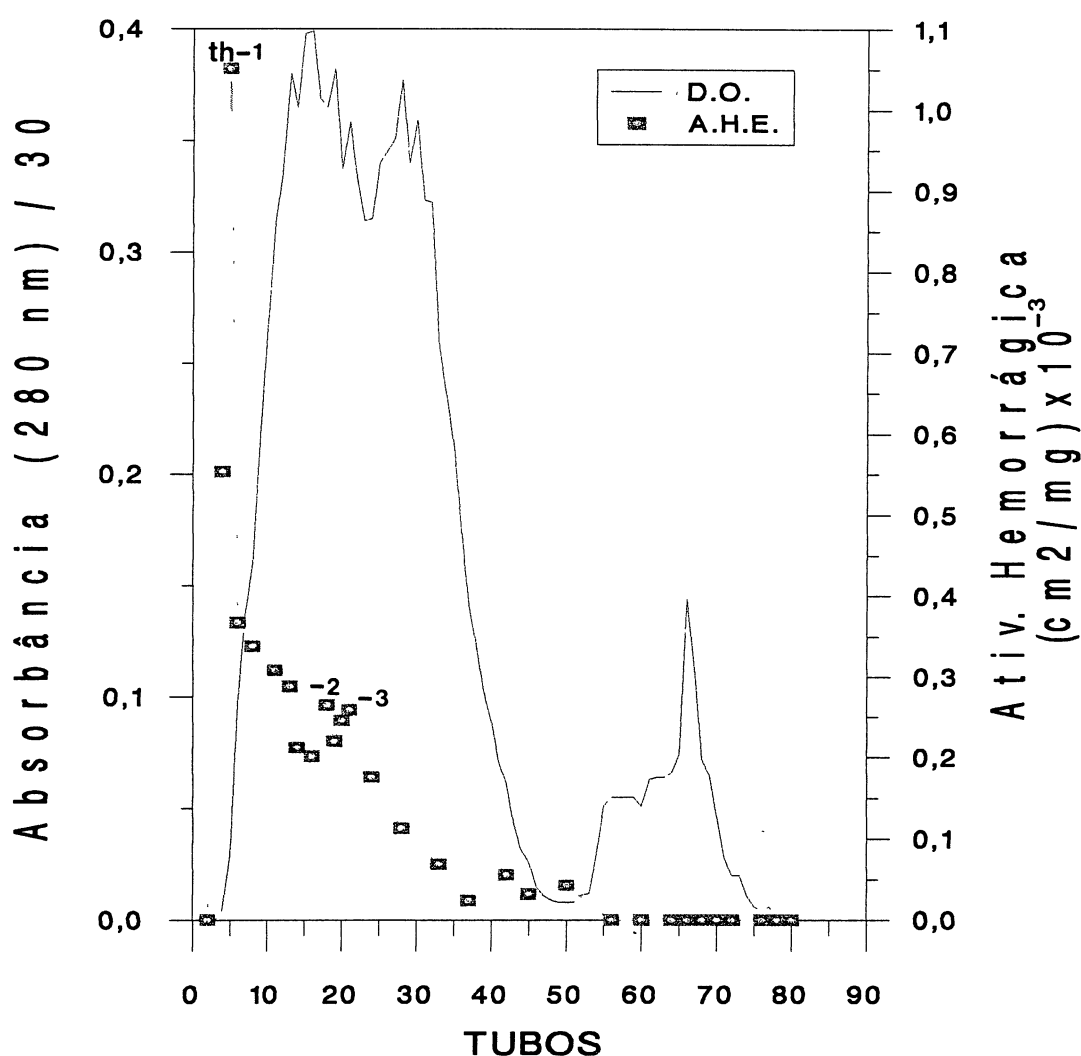
O perfil da permeação em gel de Sephadex G-100, a primeira etapa utilizada para o fracionamento do veneno de *Bothrops cotiara*, relacionado com a atividade hemorrágica, está representado na figura 1.

Os tres picos hemorrágicos observados, denominados frações hemorrágicas TH-1, TH-2 e TH-3, foram compostos, respectivamente, pelos tubos 2 à 6, 10 à 18, e 19 à 26.

Como a quantidade de proteínas da fração hemorrágica TH-1 era limitada (6.8 mg), se optou pela não recromatografia, mas diretamente pela diálise e liofilização, já que esta fração estava pouco contaminada por uma atividade proteolítica sobre a caseína, e não apresentava nenhuma das outras atividades testadas (de L-aminoácido oxidase e coagulante). Seu peso molecular, usando ovoalbumina, quimotripsinogênio e citocromo c

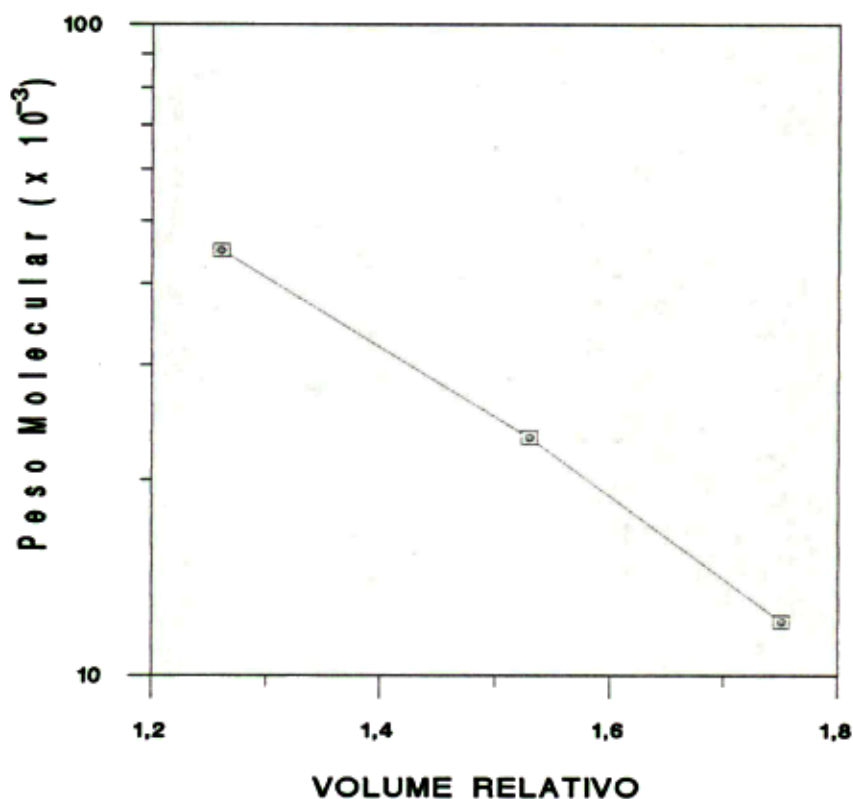
como padrões em Sephadex G-100, como ilustrado na figura 2, deve situar-se entre 50 e 100 kDa, pois o volume de eluição máximo deste pico (V_e) situa-se 21 ml além daquele apresentado pelo Blue Dextran ($V_o = 128$ ml) e 33 ml antes do V_e do quimotripsinogênio.

Figura 1: ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* FRACIONADO POR PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100



O veneno (1 g) foi aplicado numa coluna (2,5 x 60 cm) de gel de Sephadex G-100, cujo volume morto determinado com Blue Dextran foi 128 ml, e eluída com 0,05 M de Tris-HCl pH 7,5 contendo 1 mM de cloreto de cálcio; frações de 3,5 ml foram coletadas à uma velocidade de fluxo de 20 ml/hr. O conteúdo de proteína foi monitorado pela absorbância à 280 nm e dosado segundo BRADFORD (1976). A atividade hemorrágica específica [A.H.E. ($\text{cm}^2/\text{mg}) \times 10^3$] foi determinada de acordo com KONDO e cols. (1960). O tubo aqui designado de zero (0), corresponde ao volume morto (V_o) da coluna.

Figura 2: PADRÕES DE PESO MOLECULAR DA COLUNA DE SEPHADEX G-100



A amostra (2.5 ml) continha 10 mg de cada padrão, e o volume morto (Blue Dextran) foi comparado com o da permeação utilizada para o fracionamento do veneno. Foram utilizados como padrões de peso molecular: ovoalbumina (45.000), quimotripsinogênio (23.200), e citocromo c (12.100). O volume relativo equivale à V_e/V_o .

As frações TH-2 (132.6 mg) e TH-3 (135 mg), por sua vez, foram recromatografadas em coluna de DEAE-celulose.

6.1.B. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELULOSE

A fração hemorrágica TH-2 (tubos 10 à 18 da coluna de Sephadex G-100) foi recromatografada numa coluna de troca iônica de DEAE-celulose, se obtendo então 5 picos hemorrágicos, denominados: TH-2a, TH-2b, TH-2c, TH-2d e TH-2e, que correspondem respectivamente às frações 55, 89 à 105, 120 à 134, 136 à 170, e 171 à 183 (figura 3).

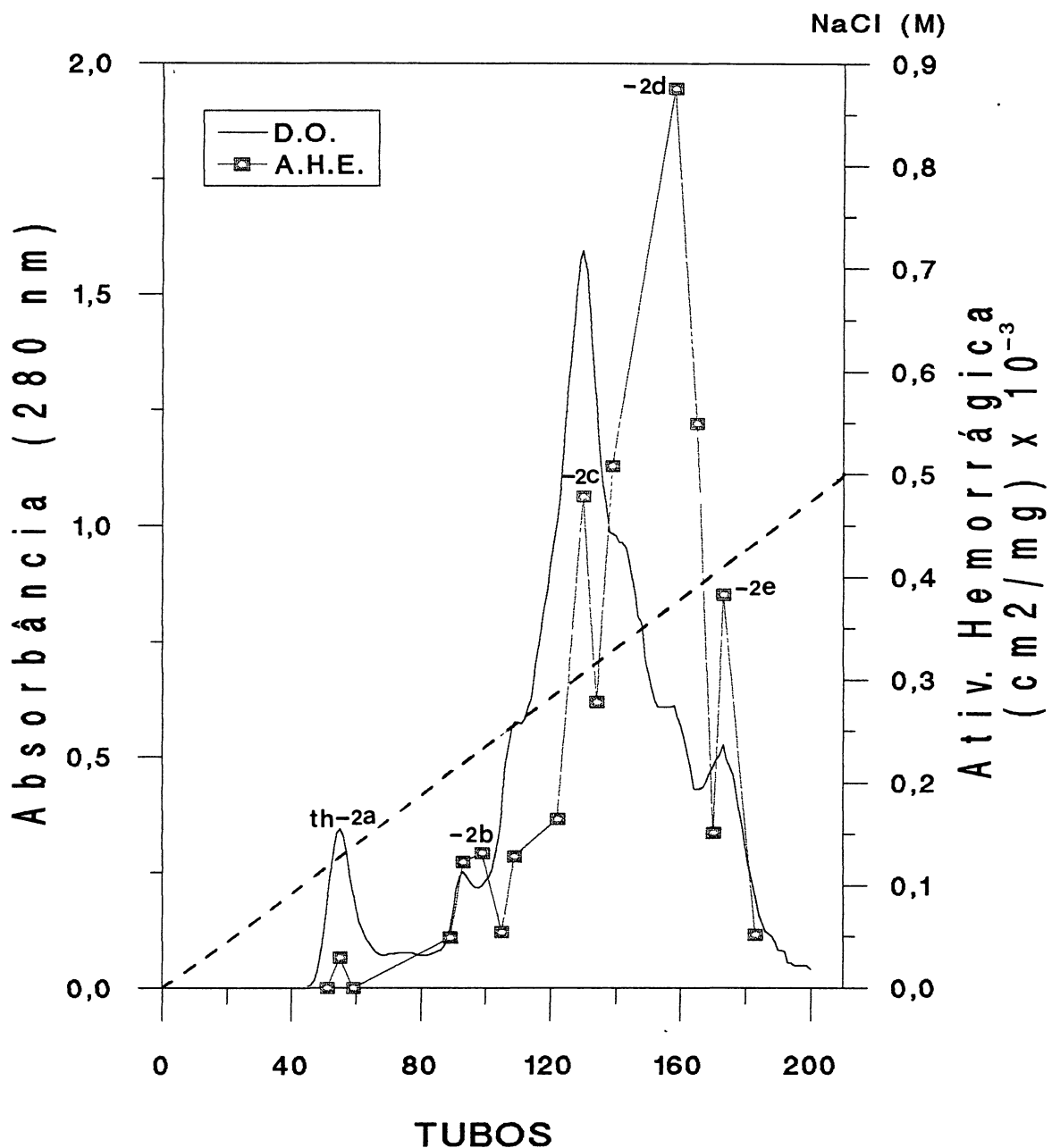
Como pode ser observado na figura 3, apesar do teor protéico ser elevado para a fração hemorrágica TH-2c, sua atividade, composta pelos tubos 120 à 134, foi menor que a da fração hemorrágica TH-2d (tabela 1), cujo teor protéico mostrou-se menor.

Tabela 1: FRACIONAMENTO DAS TOXINAS HEMORRÁGICAS DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Frações (tubos)	Atividade Hemorrágica Específica (cm ² /mg) *	Fator de Purificação
Veneno Bruto	344,0	1,00
G-100:		
TH-1 (2-6)	492,8	1,43
TH-2 (10-18)	258,8	0,75
TH-3 (19-26)	195,1	0,57
DEAE 10-18:		
TH-2a (55)	29,5	0,09
TH-2b (89-105)	90,0	0,26
TH-2c (120-134)	307,3	0,89
TH-2d (136-170)	521,0	1,51
TH-2e (171-183)	217,7	0,63
DEAE 19-26:		
TH-3a (87-112)	129,5	0,38
TH-3b (120-153)	285,7	0,83
TH-3c (155-185)	135,6	0,39

* valores médios calculados a partir das determinações das atividades individuais (tubos); a atividade hemorrágica específica do veneno bruto representa a atividade com 10 µg (tabela 2), a média utilizada em todos os experimentos.

Figura 3: CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO HEMORRÁGICA TH-2 DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, EM DEAE-CELULOSE.



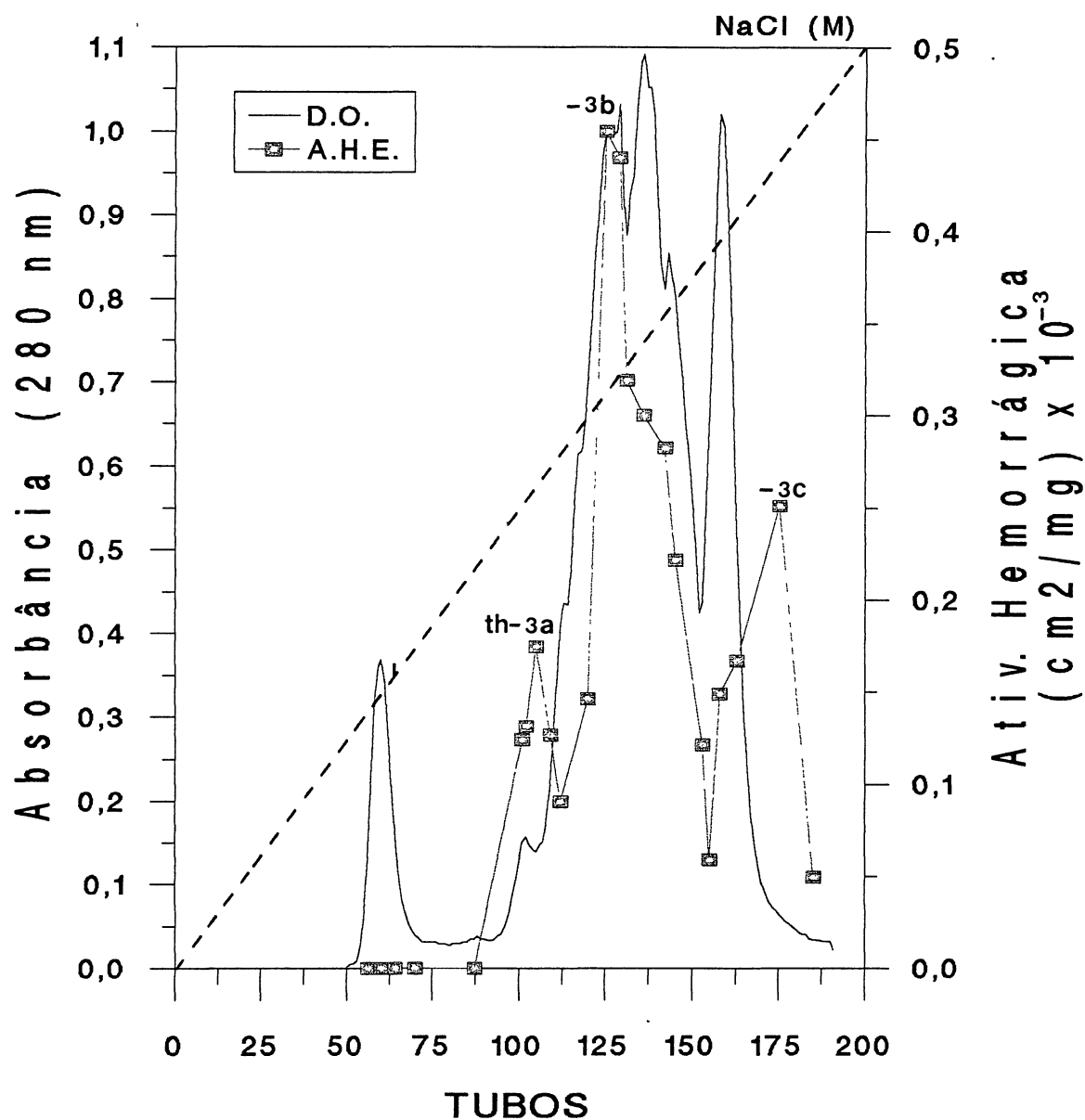
A amostra (30 ml) foi aplicada numa coluna (3 x 35 cm) de DEAE-celulose, equilibrada previamente com Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, e eluída com o mesmo tampão e com um gradiente salino operado de 0 à 0.5 M de cloreto de sódio. As frações (3 ml) foram coletadas com uma velocidade de fluxo de 18 ml/hr. O conteúdo e a dosagem de proteínas, bem como a atividade hemorrágica, foram realizadas como descritas anteriormente.

As frações hemorrágicas TH-2a e TH-2b apresentaram uma atividade muito menor que a do veneno bruto, com fatores de purificação de apenas 0.09 e 0.26, respectivamente. Na fração TH-2e foi observado um fator de purificação de 0.63 (tabela 1).

Com relação a fração hemorrágica TH-3 (tubos 19 à 26 da Sephadex G-100), esta também passou pela mesma etapa de recromatografia em DEAE-celulose, donde se obteve 3 picos com atividade hemorrágica (figura 4), resultando nas frações TH-3a (tubos 87 à 112), TH-3b (tubos 120 à 153), TH-3c (tubos 155 à 185).

À exceção da fração intermediária TH-2c (pico protéico com absorbância em torno de 1), as demais resultaram em apreciável aumento relativo de atividade (absorbância à 280 nm nos picos máximos de eluição entre 0.15 e 0.1 unidades).

Figura 4: CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO HEMORRÁGICA TH-3 DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, EM DEAE-CELULOSE.



A amostra (24 ml) foi aplicada numa coluna (3 x 35 cm) de DEAE-celulose, previamente equilibrada com Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, e eluída com o mesmo tampão e com um gradiente operado de 0 à 0.5 M de cloreto de sódio. As frações (3 ml) foram coletadas à uma velocidade de fluxo de 18 ml/hr. O conteúdo e a dosagem de proteínas, assim como a atividade hemorrágica, foram determinadas como descrito anteriormente.

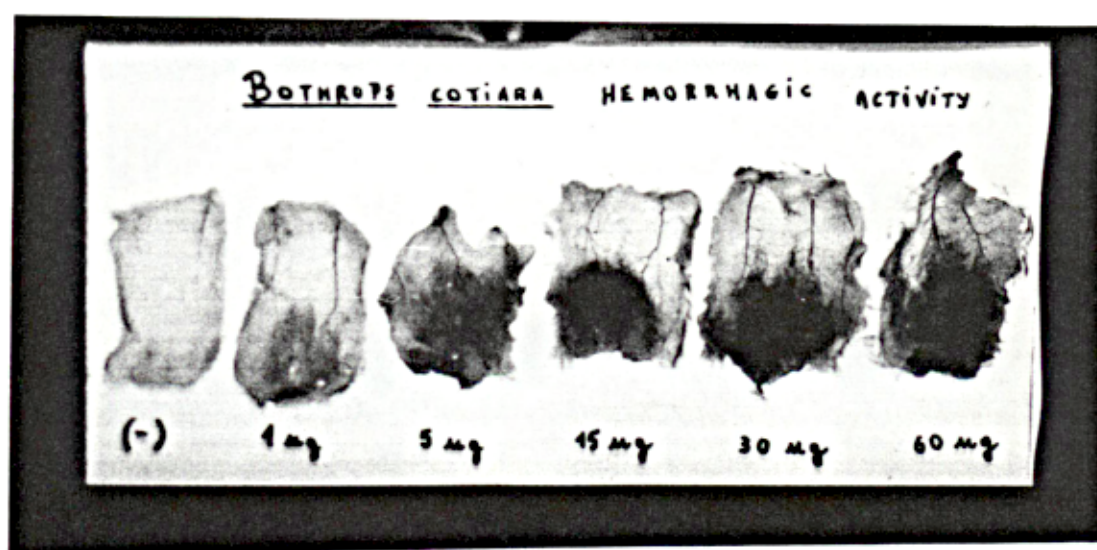
6.1.C. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE: ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A relação existente entre a dose de veneno bruto e a atividade hemorrágica foi determinada (tabela 2), e está ilustrada pela figura 5.

Tabela 2: DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE: ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*

Veneno Bruto (μg)	Área Hemorrágica (mm^2)	Atividade Hemorrágica Específica (cm^2/mg)
0,5	91,8	1.840
1,0	161,8	1.620
2,5	234,5	940
5,0	283,3	566
10,0	344,0	344
15,0	389,3	259
30,0	471,3	157
45,0	472,0	105

Figura 5: ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

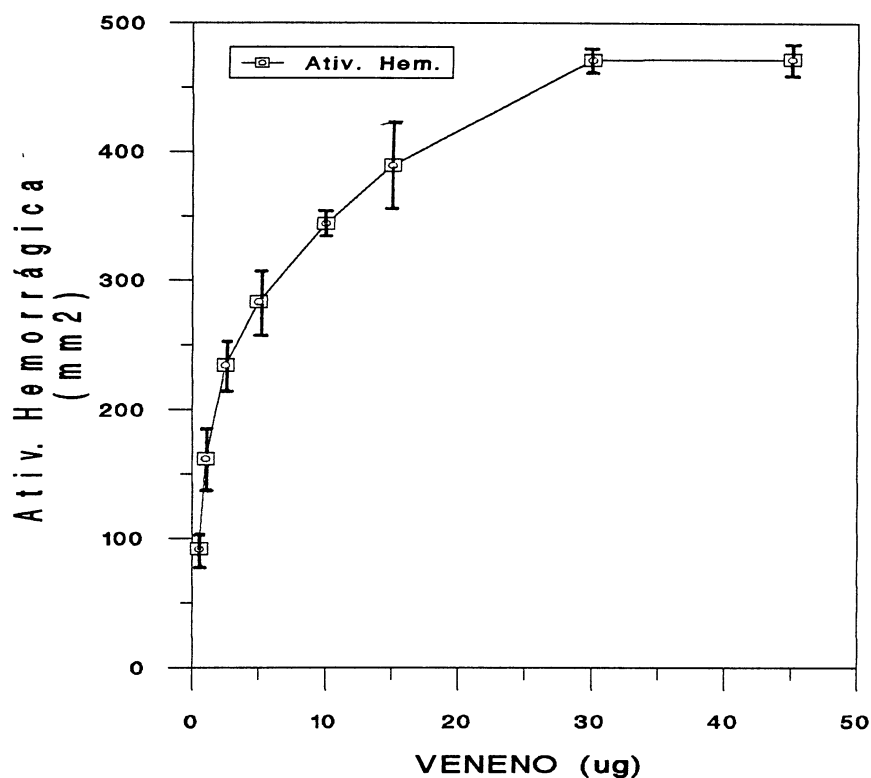


As amostras de veneno, em 100 μl de NaCl 0.085%, nas doses indicadas, foram injetadas intradermicamente em camundongos da linhagem Swiss Webster, pesando entre 18 e 22 gr. Após 2 horas, a área hemorrágica foi medida. O controle (-) foi realizado pela inoculação apenas de solução salina.

Como pode ser observado na figura 6, a atividade hemorrágica se comportou de forma semelhante à atividade de uma enzima, obedecendo a cinética de Michaelis & Menten, com saturação da enzima (veneno/fração hemorrágica) pelo substrato (componentes da matriz extracelular da pele de camundongo).

Este fato se torna deveras importante, ao se considerar que os experimentos com as frações cromatográficas da Sephadex G-100 e da DEAE-celulose se realizaram com quantidades diferentes de frações hemorrágicas (5 à 20 ug), se fazendo necessário, então, a correção entre a dose utilizada e a resposta esperada. Por isto, para o cálculo do fator de purificação das frações derivadas do veneno bruto, se utilizou a resposta da fração em relação à resposta do veneno bruto na mesma dose (fator de correção), ou seja, para o cálculo do fator de purificação, obtido pela divisão do valor da atividade hemorrágica da fração pelo valor da atividade hemorrágica do veneno bruto, se utilizou, ao invés de um único valor de atividade do veneno bruto, o valor desta atividade quando se administrou a mesma dose do que a fração. Se fosse considerado a atividade hemorrágica específica de apenas uma dose de veneno bruto, o fator de purificação poderia estar sub- ou super-estimado, já que as atividades hemorrágicas específicas diminuiram com o aumento da dose (tabela 2), embora a atividade hemorrágica (em área) continuasse aumentando.

Figura 6: DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE: ATIVIDADE HEMORRÁGICA, DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*.



A atividade hemorrágica (mm^2) foi determinada segundo KONDO e cols. (1960), modificada por GUTIÉRREZ e cols. (1985), com a inoculação intra-dérmica de 0.1 ml de solução de veneno, na pele dorsal de camundongos, sendo a área hemorrágica determinada 2 horas após a inoculação.

6.1.D. ANÁLISE DO TEOR DE ZINCO NO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Sabendo-se que as toxinas hemorrágicas normalmente são metaloproteases Zn^{+2} -dependentes, foi realizada a determinação deste íon no veneno bruto de *Bothrops cotiara* por espectrofotometria de absorção atômica, e o resultado do teor deste elemento foi de 990 $\mu\text{g/g}$ de veneno.

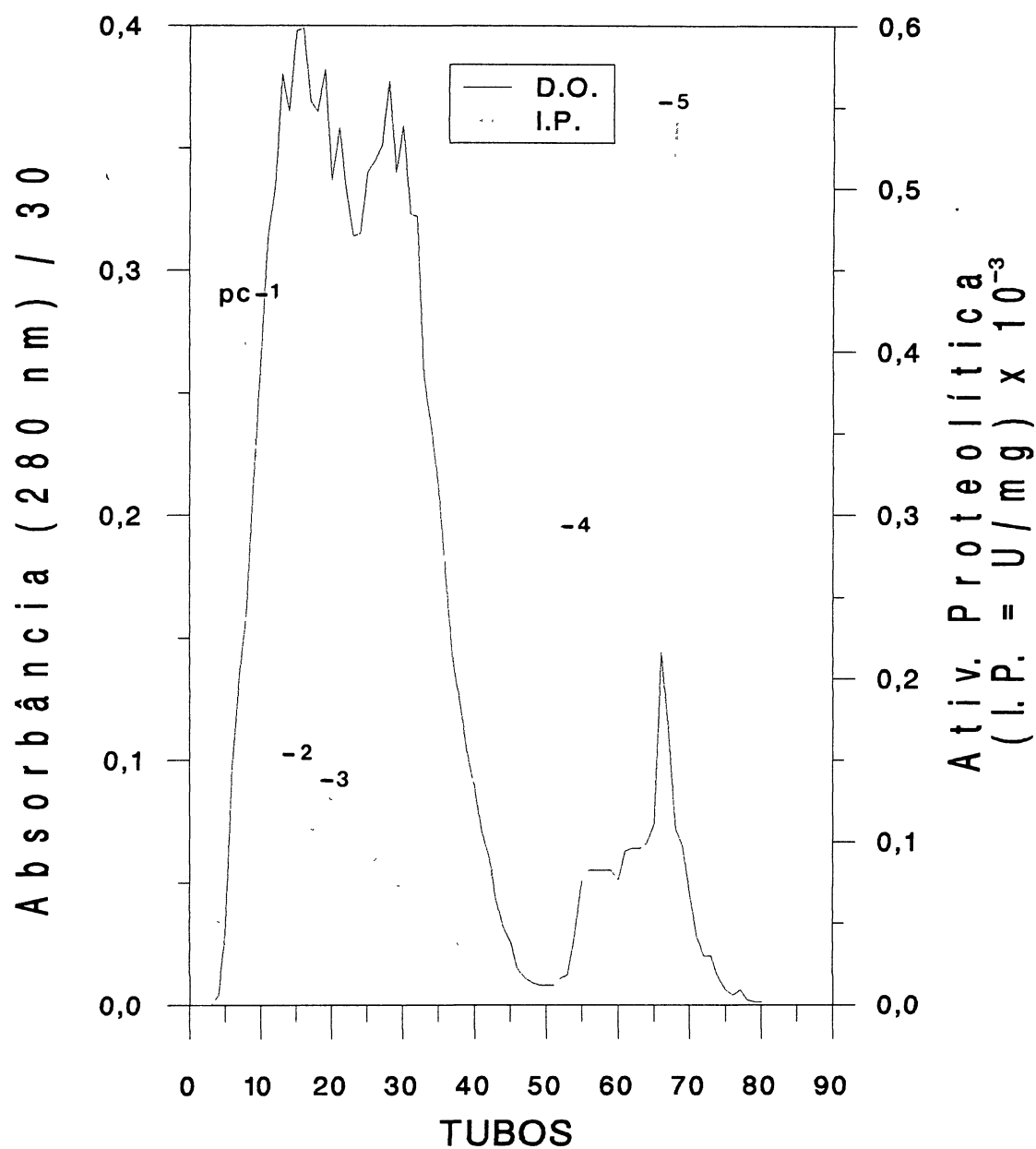
6. 2. FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE A CASEÍNA DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Como pode ser observado na figura 7, o veneno de *Bothrops cotiara*, ao ser fracionado por permeação em gel de Sephadex G-100, mostrou 5 frações de atividade proteolítica sobre a caseína, denominadas proteases caseinolíticas PC-1 (tubos 3 à 13), PC-2 (tubos 14 à 16), PC-3 (tubos 17 à 36), PC-4 (tubos 37 à 56) e PC-5 (tubos 57 à 76), tres delas desvinculadas das frações hemorrágicas, embora estas apresentassem alguma atividade caseinolítica basal presente, aliás, em todas as frações.

As frações caseinolíticas PC-4 e PC-5, por apresentarem quantidades diminutas de proteínas (34,8 e 13 mg, respectivamente), não puderam ser posteriormente trabalhadas. Já as frações PC-1, PC-2 e PC-3 foram desmembradas nas frações compostas pelos tubos 7 à 9 e 10 à 18 em função da preferência em se explorar a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops cotiara*, deixando em segunda instância a atividade caseinolítica. A fração 7 à 9, como apresentava pequena quantidade de proteínas (15.8 mg), foi dialisada e liofilizada sem mais passos cromatográficos. Através da permeação em gel de Sephadex G-100 e utilizando os mesmos padrões anteriormente citados, o peso molecular desta fração é ligeiramente superior ao da ovoalbumina.

Por outro lado, quando recromatografou-se a fração 10 à 18 da Sephadex G-100 numa coluna de DEAE-celulose, foram verificados 6 picos principais de atividade caseinolítica, correspondentes aos tubos 48 à 58 (PC-a), 59 à 121 (PC-b), 130 à 169 (PC-c), 170 à 182 (PC-d), e 183 à 193 (PC-e) (figura 8). Enquanto a fração PC-a apresentou, simultaneamente, discretas atividades hemorrágica, coagulante, e de LAO, a fração PC-b não se relacionou com qualquer atividade hemorrágica. Ainda, a fração PC-c apresentou uma nítida relação com a fração hemorrágica TH-2d e, de modo similar, a fração PC-d também se mostrou nitidamente relacionada com uma fração hemorrágica (TH-2e). Ao contrário, as frações hemorrágicas TH-2b e TH-2c estavam apenas contaminadas por traços de atividade caseinolítica (nível basal).

Figura 7: ATIVIDADE CASEINOLÍTICA DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* FRACIONADO POR PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100.



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade proteolítica, expressa em $U/mg \times 10^3$ (Índice Proteolítico- I.P.-), foi determinada de acordo com KUNITZ (1947), sendo $1U = D.O. 280 \text{ nm} \times 100$.

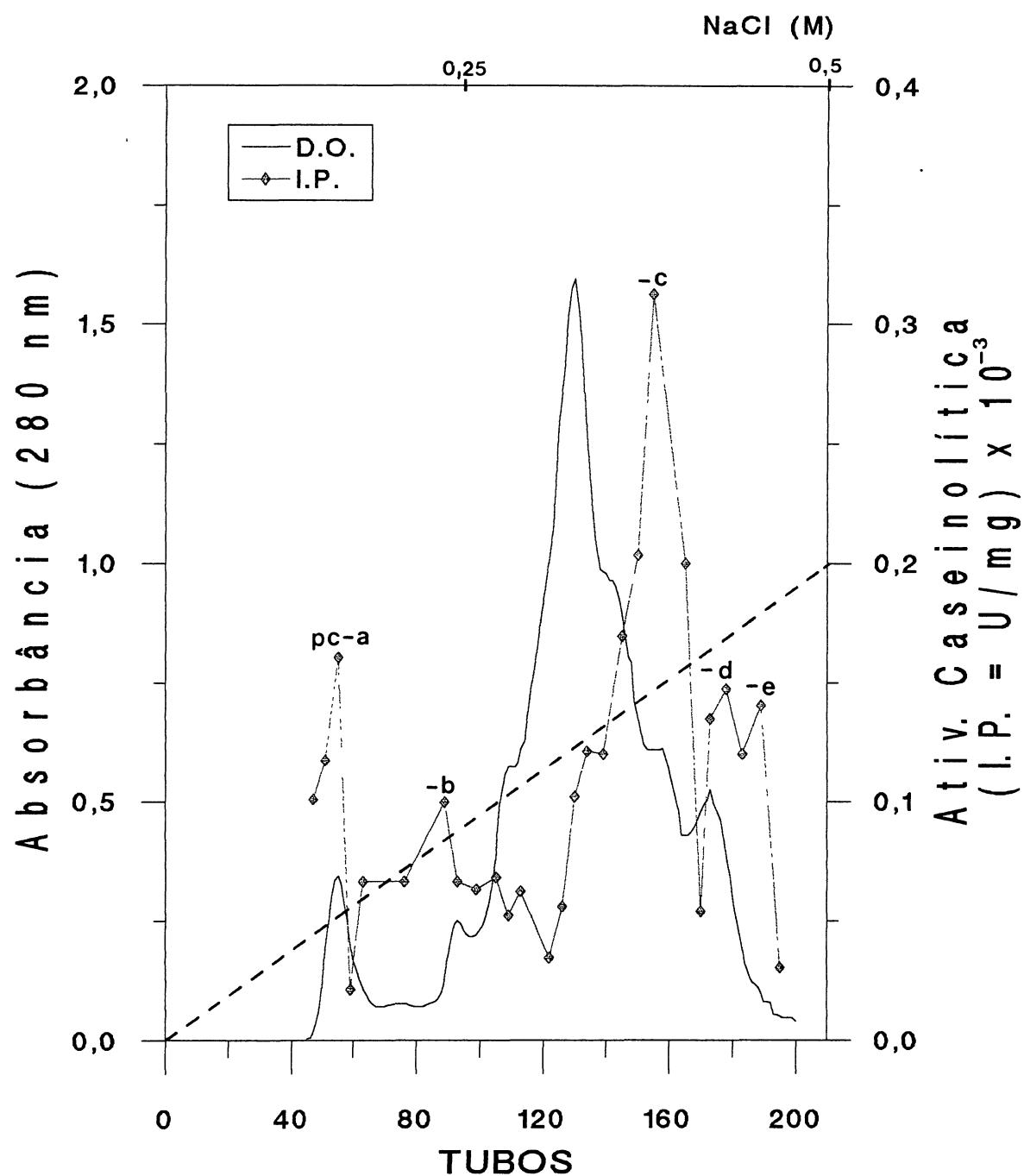
Havendo o objetivo maior de caracterizar o veneno de *Bothrops cotiara* quanto às atividades hemorrágica e de L-aminoácido oxidase, as frações cromatográficas obtidas em Sephadex G-100 e em DEAE-celulose, foram preferencialmente unidas de acordo com estas atividades e não de acordo com a atividade proteolítica sobre a caseína. Por isto o fato de algumas frações caseinolíticas, como por exemplo a PC-c, estarem sub-divididas em vários segmentos (tabela 7).

Os dados de atividade proteolítica sobre a caseína (I. P.) e fator de purificação destas frações estão mostrados na tabela 3.

Tabela 3: FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE A CASEÍNA DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Frações (tubos)	I.P. (U/mg)	Fator de Purificação
Veneno Bruto	64,0	1,00
G-100:		
PC-1 (3-13)	216,5	3,38
PC-2 (14-16)	130,2	2,03
PC-3 (17-36)	90,3	1,41
PC-4 (37-56)	119,5	1,87
PC-5 (57-76)	245,2	3,83
DEAE 10-18:		
PC-a (48-58)	92,7	1,45
PC-b (59-121)	63,1	0,99
PC-c (122-169)	179,4	2,80
PC-d (170-182)	112,1	1,75
PC-e (182-193)	97,1	1,52

Figura 8: CROMATOGRAFIA DAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS CONTIDAS NA FRAÇÃO 10-18 DO SEPHADEX G-100, EM DEAE-CELULOSE.



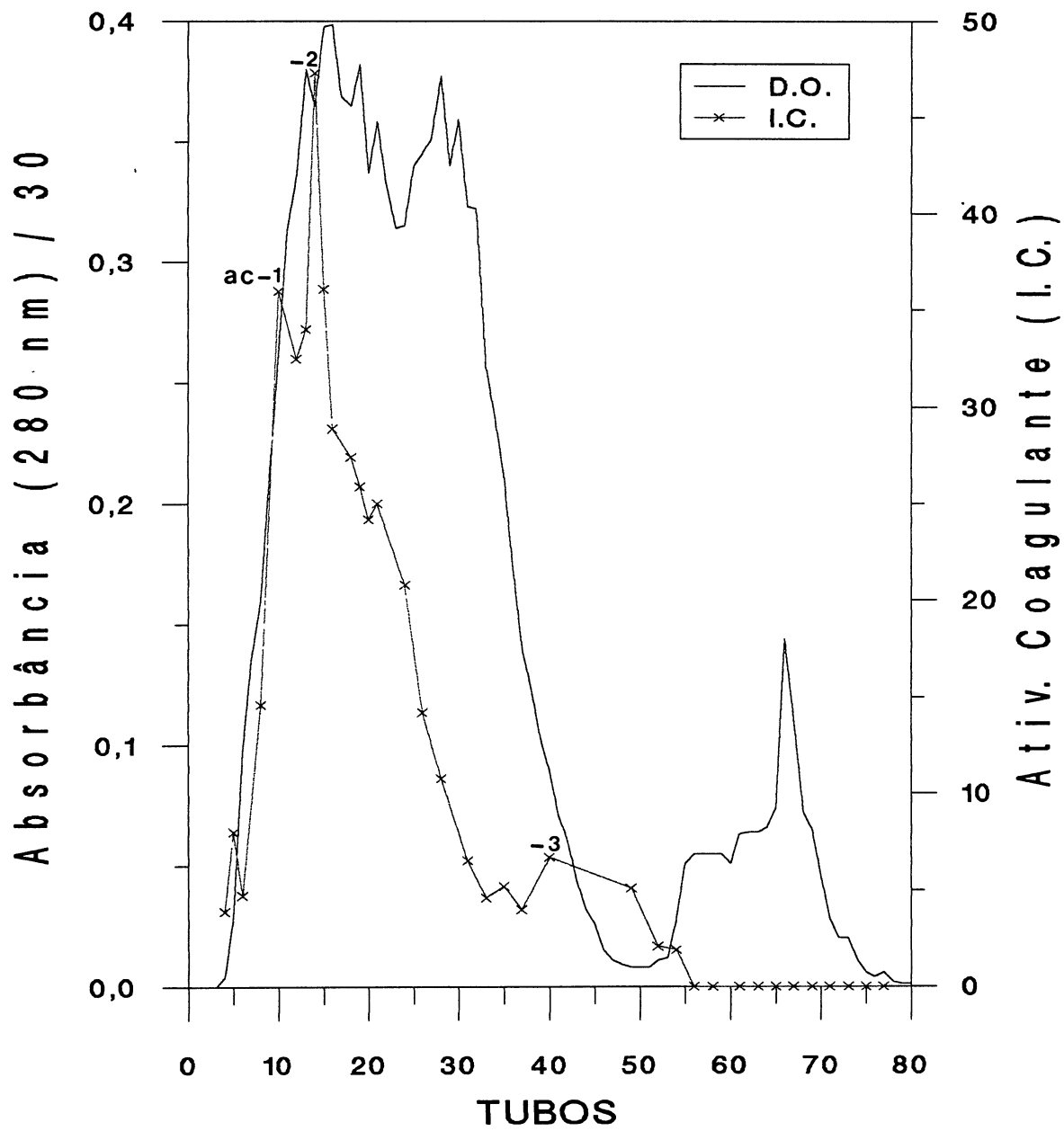
A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade proteolítica, expressa em $\text{U/mg} \times 10^3$ (Índice Proteolítico- I.P.), foi determinada segundo KUNITZ (1947), sendo $1\text{U} = \text{D.O. } 280 \text{ nm} \times 100$.

6.3. FRACIONAMENTO DA ATIVIDADE COAGULANTE "THROMBIN-LIKE" DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

A atividade coagulante tipo trombina, a qual expressa a capacidade de algumas enzimas em converterem o fibrinogênio em géis de fibrina, foi determinada tanto no veneno bruto de *Bothrops cotiara*, quanto nas suas frações cromatográficas. Da permeação em gel de Sephadex G-100 se obteve 3 picos principais com atividade coagulante, representados pelos tubos 4 à 12, 13 à 32 e 40 à 55, como mostrado na figura 9.

Com a prioridade sendo a caracterização do veneno de *Bothrops cotiara* quanto às atividades hemorrágica e de LAO, partes destes picos foram juntados (tubos 10 à 18) e submetidos à recromatografia em DEAE-celulose, donde se obteve cinco picos com atividade coagulante, formados respectivamente pelos tubos 48 à 61 (AC-a), 82 à 98 (AC-b), 106 à 132 (AC-c), 133 à 168 (AC-d), e tubos 170 à 190 (AC-e) sendo o terceiro pico o com maior atividade.

Figura 9: ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* FRACIONADO POR PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100.



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade coagulante, expressa em Índice de Coagulação (I.C.), definida como o inverso do tempo de coagulação multiplicado por 100 e por um fator de diluição (d), foi determinada de acordo com THEAKSTON & REID (1983).

Na sequência, as frações 19 à 26 da permeação em gel de Sephadex G-100 foram juntadas e também submetidas ao mesmo procedimento de recromatografia em DEAE-celulose (figura 11), donde se obteve 3 picos com atividade coagulante, já que a amostra (frações 19 à 26) era composta pela atividade remanescente da permeação em gel de Sephadex G-100, e era esperado apenas um pico de atividade coagulante.

Tabela 4: FRACIONAMENTO DAS ENZIMAS COAGULANTES DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

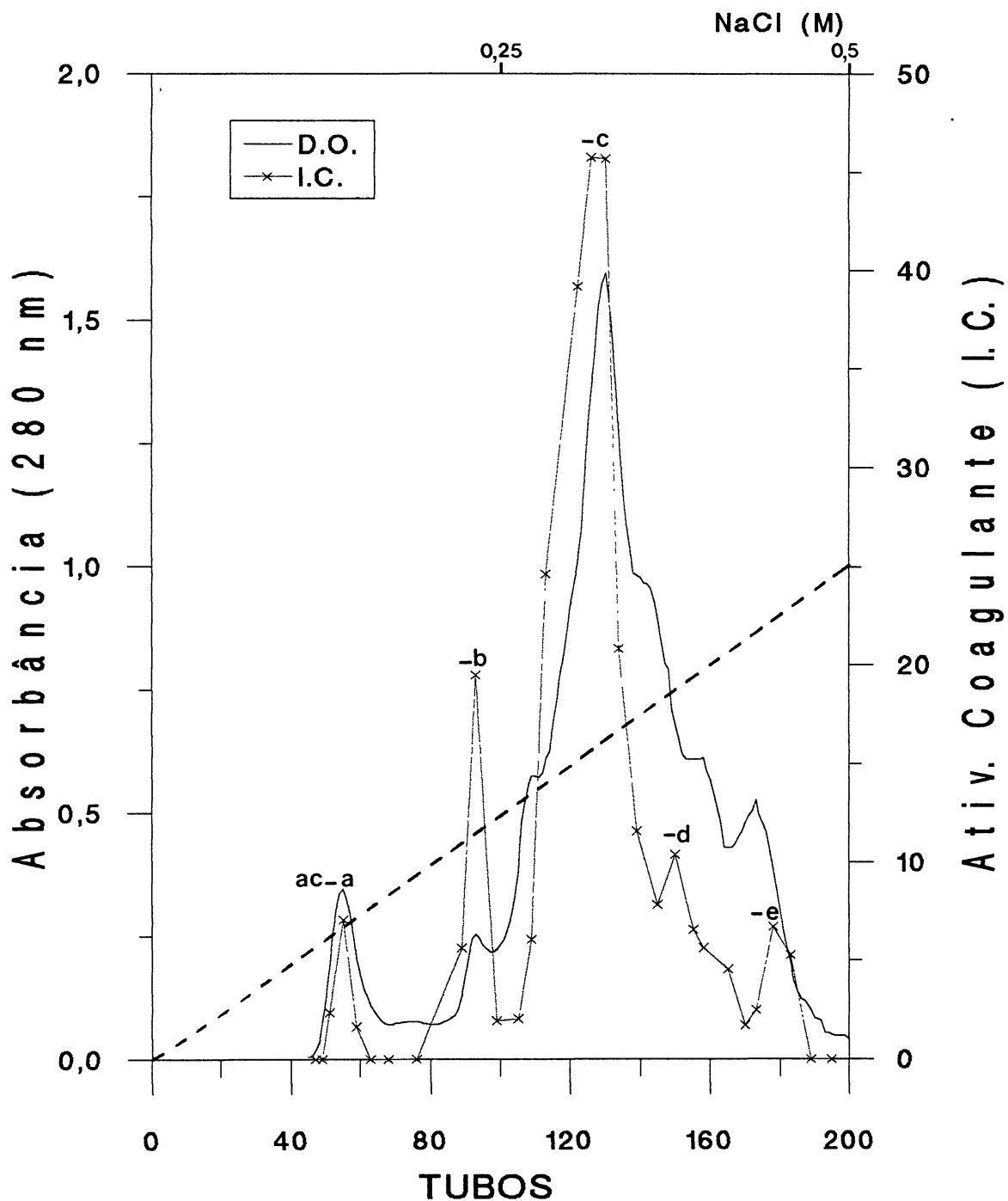
Frações (tubos)	I. C. *	Fator de Purificação
Veneno Bruto	7,7	1,00
G-100:		
AC-1 (4-12)	16,6	2,16
AC-2 (13-32)	25,1	3,26
AC-3 (40-55)	2,7	0,35
DEAE 10-18:		
AC-a (48-61)	3,7	0,48
AC-b (82-98)	9,0	1,17
AC-c (106-132)	28,9	3,75
AC-d (133-168)	13,1	1,70
AC-e (170-190)	3,2	0,42
DEAE 19-26:		
AC- f (60-90)	1,6	0,21
AC-g (100-114)	5,0	0,65
AC-h (115-135)	12,1	1,57

* Inverso do tempo de coagulação da solução de fibrinogênio pelo veneno bruto ou pela fração, multiplicado por 100.

A tabela 4 mostra o fracionamento da atividade coagulante do veneno de *Bothrops cotiara*, incluindo atividade coagulante (I.C.) e fator de purificação.

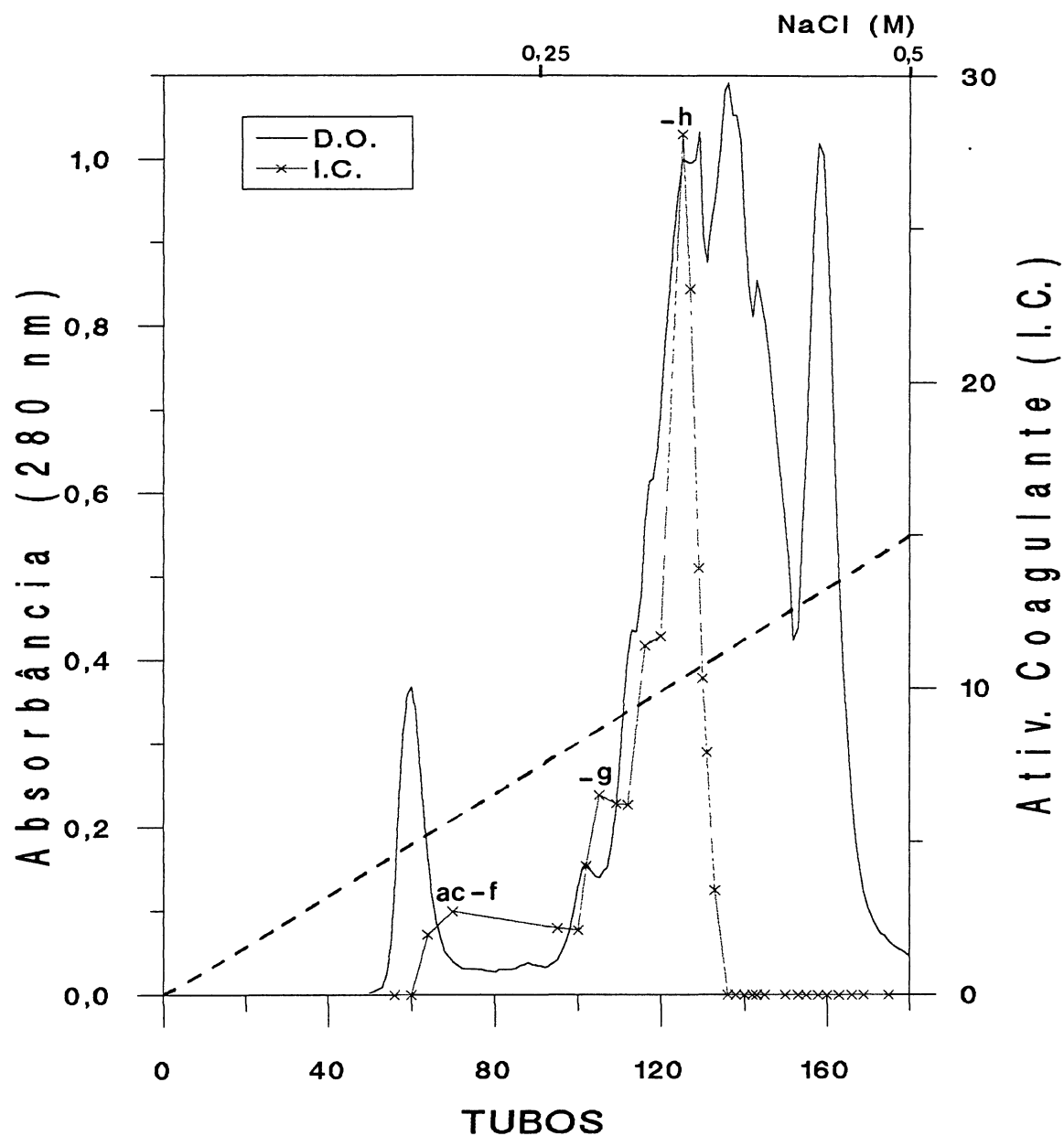
É de se notar que ambas cromatografias (figuras 10 e 11), oriundas de diferentes frações da Sephadex G-100, resultaram num mesmo volume de eluição (gradiente salino de eluição, aproximadamente tubo 120). A interpretação seria que trata-se de entidades com diferentes pesos moleculares mas cargas (faixa acídica de pH) equivalentes.

Figura 10: ATIVIDADE COAGULANTE DA FRAÇÃO 10-18 DA CROMATOGRAFIA EM GEL DE SEPHADEX G-100 DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, SUBMETIDA A DEAE CELULOSE



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 2. A atividade coagulante, expressa em Índice de Coagulação (I.C.), definida como o inverso do tempo de coagulação multiplicado por 100 e pelo fator de diluição (d), foi determinada segundo THEAKSTON & REID (1983).

Figura 11: ATIVIDADE COAGULANTE DA FRAÇÃO 19-26 DA CROMATOGRAPHIA EM GEL DE SEPHADEX G-100 DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, SUBMETIDA A DEAE CELULOSE



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 2. A atividade coagulante, expressa em Índice de Coagulação (I.C.), e definida como o inverso do tempo de coagulação multiplicado por 100 e pelo fator de diluição (\bar{d}), foi determinada segundo THEAKSTON & REID (1983).

6.4. FRACIONAMENTO DAS ISOENZIMAS DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO) DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

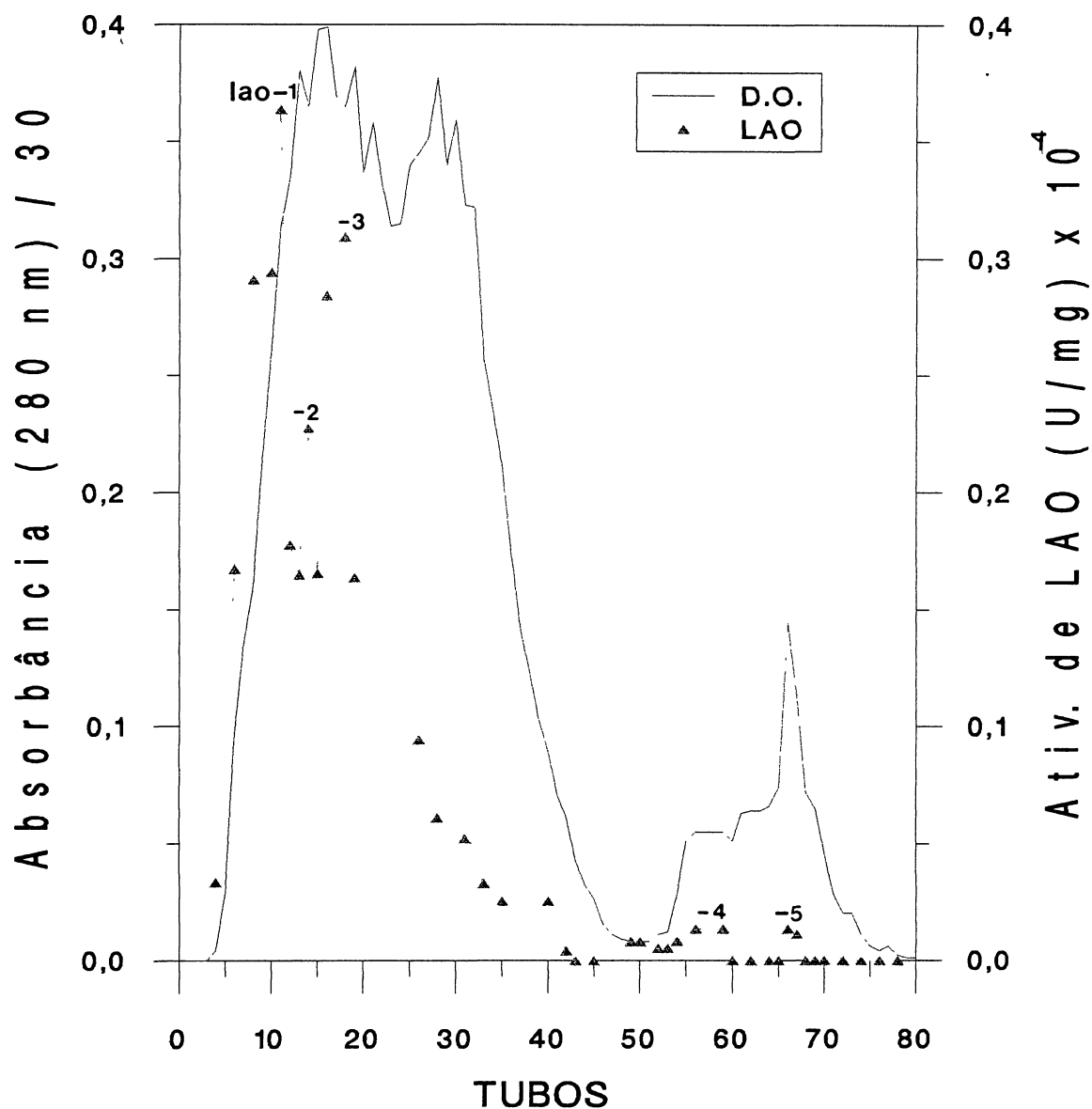
O rastreamento da atividade de L-aminoácido oxidase por permeação molecular, mostrou que o Sephadex G-100 permitiu a resolução de 3 picos principais, ditos de alta atividade (LAO-1, tubos 4 à 13; LAO-2, tubos 14 à 16; e LAO-3, tubos 17 à 42), secundados por duas frações de menor dimensão molecular e atividade enzimática (LAO-4, tubos 50 à 60, e LAO-5, tubos 66 e 67) - figura 12.

Pelo fato das atividades hemorrágica, caseinolítica e de LAO estarem muito próximas, algumas inclusive coincidindo, todas as 3 frações com alta atividade de L-aminoácido oxidase foram juntadas (tubos 10 à 18) e recromatografadas em DEAE-celulose, se obtendo um perfil que apresentou 5 picos de atividade de LAO (tubos 45 à 60, 62 à 88, 99 à 136, 140 à 165, e 170 à 195), um deles com a maior atividade de todas as frações (figura 13).

Dado a circunstância do pico LAO-3 apresentar em seu lado descendente tanto farto material protéico, quanto atividade residual de LAO, um "pool" a parte foi feito envolvendo os tubos 19 à 26. Este material foi então recromatografado em DEAE-celulose, e o novo perfil de atividade de LAO (figura 14), justificou a precaução da recromatografia, já que uma resolução para 5 novos picos de atividade de LAO foi alcançada com este expediente, com a vantagem adicional de que 4 destes picos (LAO-3a, -3b, -3c e -3e) ocorreram em zonas de eluição de menor densidade protéica.

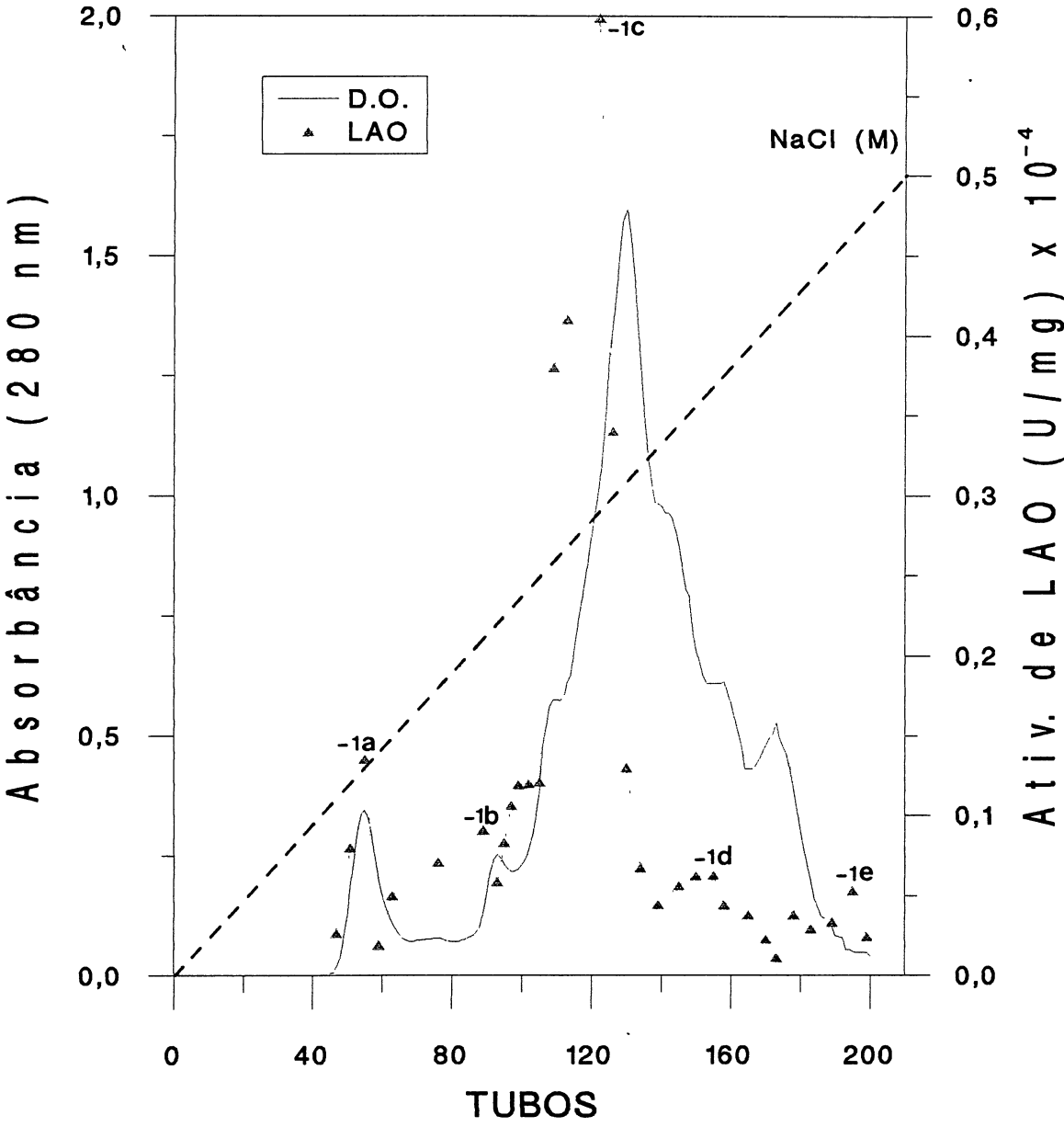
O pico mais proeminente de atividade de LAO, denominado LAO-3c e representado pelos tubos 101 à 116, embora guarde uma certa analogia de carga com as anteriormente definidas frações TH-3a e TH-3b (figura 4), seguramente deve possuir identidade molecular própria, posto que seu volume de eluição, ou melhor, o gradiente de salinidade para removê-la da resina, é intermediário e equidistante dos 2 picos hemorrágicos acima mencionados.

Figura 12: ATIVIDADE DE L-AMINO ÁCIDO OXIDASE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, FRACIONADO POR PERMEAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-100.



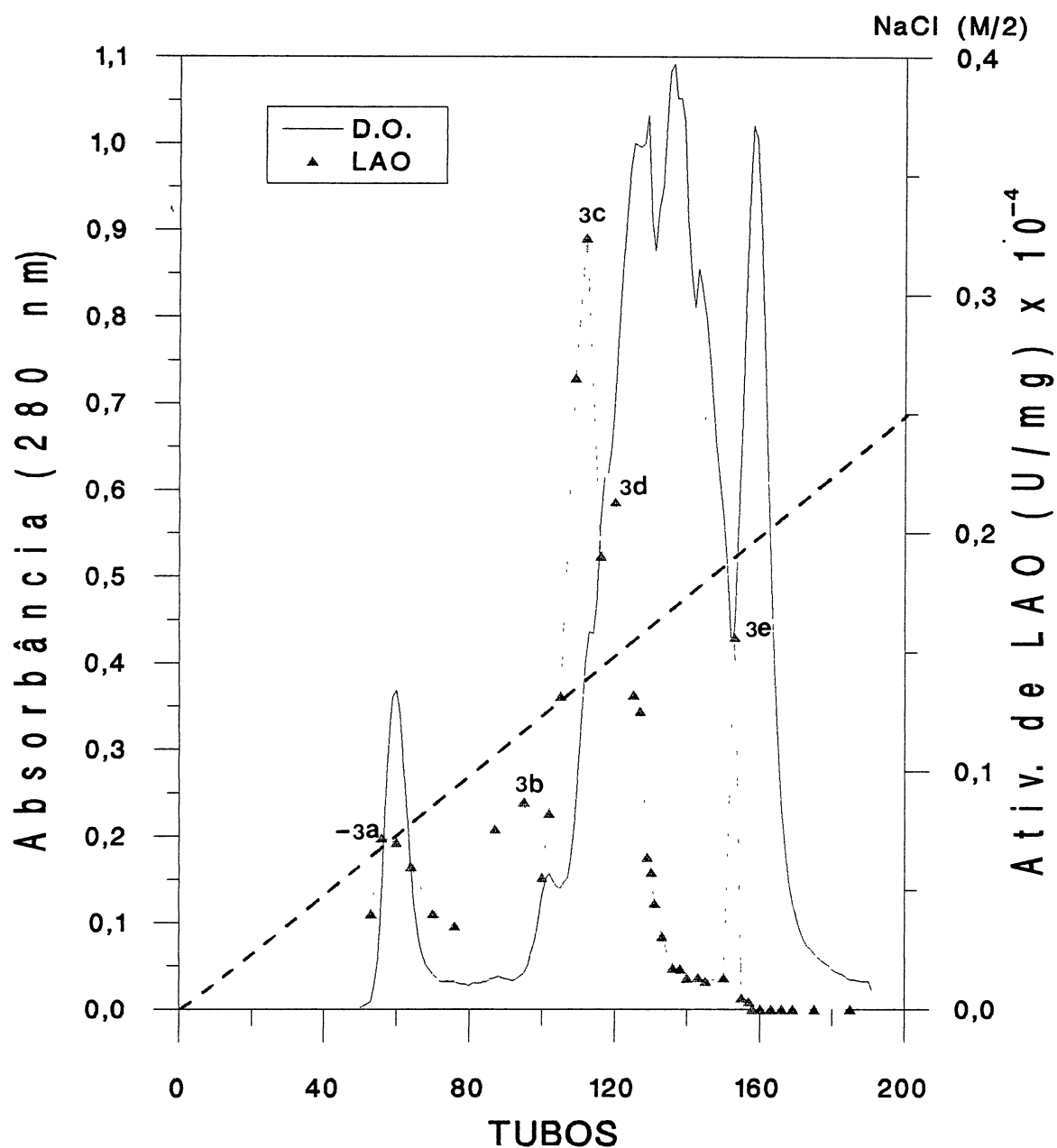
A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade de L-aminoácido oxidase (LAO) foi determinada de acordo com AISAKA & TERADA (1981), utilizando o aminoácido L-leucina como substrato, e expressada em $U \times 10^{-4}/mg$.

Figura 13: DEAE-CELULOSE DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*, CONTIDA NA FRAÇÃO 10-18 DO SEPHADEX G-100



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade de L-aminoácido oxidase (LAO) foi determinada de acordo com AISAKA & TEREDA (1981), utilizando o aminoácido L-leucina como substrato, e expressada em U x 10⁻⁴/mg.

Figura 14: DEAE-CELULOSE DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* CONTIDA NA FRAÇÃO 19-26 DO SEPHADEX G-100.



A etapa de purificação foi a mesma descrita na figura 1. A atividade de L-aminoácido oxidase (LAO) foi determinada de acordo com AISAKA & TEREDA (1981), utilizando o aminoácido L-leucina como substrato, e expressada em $U \times 10^{-4} / mg$.

Os dados de fracionamento da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara*, incluindo atividade específica (A.E.) e fator de purificação, estão mostrados na tabela 5.

Tabela 5: FRACIONAMENTO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Frações (tubos)	LAO A. E. (U/mg)	Fator de Purificação
Veneno Bruto	992,0	1,00
G-100:		
LAO-1 (4-13)	2150,1	2,17
LAO-2 (14-16)	2257,8	2,28
LAO-3 (17-42)	1312,4	1,38
LAO-4 (50-60)	60,3	0,06
LAO-5 (66-67)	122,0	0,13
DEAE 10-18:		
LAO-1a (45-60)	509,9	0,51
LAO-1b (62-68)	528,6	0,53
LAO-1c (99-136)	2463,4	2,48
LAO-1d (140-165)	514,6	0,52
LAO-1e (170-195)	312,6	0,32
DEAE 19-26:		
LAO-3a (64-68)	530,0	0,53
LAO-3b (69-100)	586,4	0,59
LAO-3c (101-116)	1769,6	1,78
LAO-3d (117-142)	662,9	0,67
LAO-3e (143-158)	88,4	0,09

6.4.A. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAO) DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA* SOBRE VÁRIOS SUBSTRATOS

A atividade de LAO do veneno bruto de *Bothrops cotiara* foi ensaiada sobre vários substratos, usuais e não usuais para esta enzima, como está sumarizado na tabela 6. Os L-aminoácidos mais eficientemente desaminados pela enzima foram, respectivamente: metionina, leucina, triptofano e fenilalanina. Aminoácidos como cistina, histidina, tirosina, isoleucina e cisteína foram fracamente desaminados, enquanto outros aminoácidos não sofreram catálise enzimática.

Tabela 6: ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA* SOBRE DIFERENTES SUBSTRATOS

Aminoácido *	LAO A. E. (U/mg)
L- Metionina	917,58
L- Leucina	883,84
L- Triptofano	717,74
L- Fenilalanina	582,79
L- Cistina	46,61
L- Histidina	40,39
L- Tirosina	25,89
L- Isoleucina	18,12
L- Cisteína	7,77

* Substratos na concentração de 2 mM

6.4.B. ANÁLISE ESPECTRAL DA COENZIMA PARA A L-AMINOÁCIDO OXIDASE

A análise espectral do veneno de *Bothrops cotiara*, de 700 à 200 nm, foi comparada com a mesma análise de uma solução de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a qual apresentou 3 picos de absorção (270, 390 e 465 nm), como mostrado no "inside" da figura 15.

O veneno apresentou 2 bandas de absorção (390 e 465 nm), correspondendo efetivamente às duas bandas da solução de FAD (figura 15). A terceira banda em torno de 270 nm, obviamente corresponde à faixa de absorção das proteínas presentes no veneno.

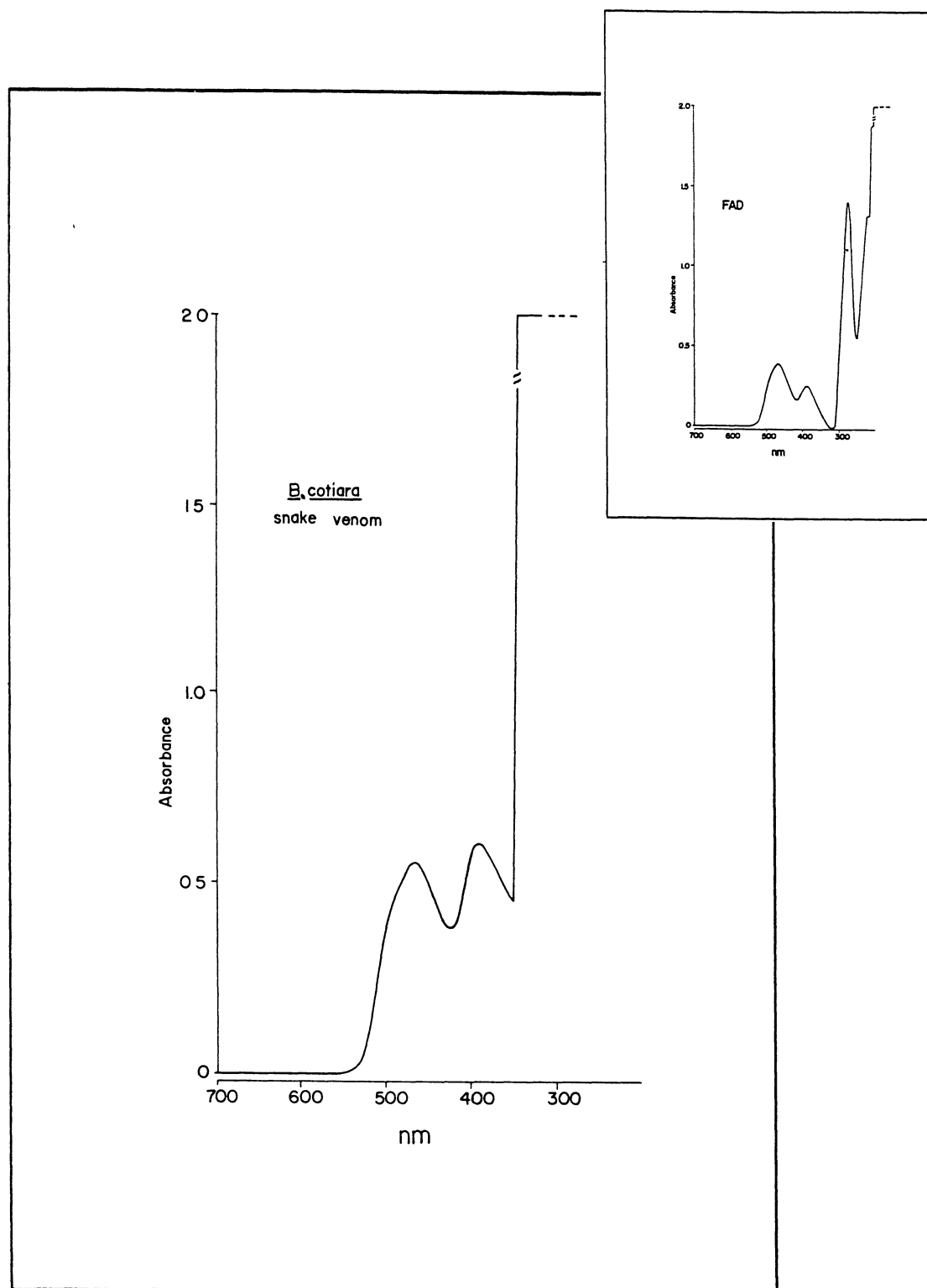


Figura 15: ANÁLISE ESPECTRAL DO COENZIMA (FAD) DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*. NO "INSIDE", O PERFIL DO PADRÃO DE FAD.

6.5. SUMÁRIO DOS PROCEDIMENTOS DE FRACIONAMENTO EM GEL DE SEPHADEX E EM DEAE-CELULOSE DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*

Para efeito de combinação dos tubos de eluição das colunas cromatográficas, priorizou-se o perfil das atividades hemorrágica e de L-aminoácido oxidase. A partir delas foram selecionados os "pools" de maior atividade, que estão dispostas na tabela 7, juntamente com resultados equivalentes, obtidos das outras 2 atividades de interesse: proteolítica sobre a caseína e coagulante.

Se destaca nestes dados a atividade hemorrágica da fração 120 à 136, que foi superior a da fração 158 à 163. Como pode ser verificado na tabela 1, a atividade hemorrágica da fração TH-2c (120 à 134), obtida pelas determinações das atividades individuais (por tubos), tinha sido menor que a da fração TH-2d (136 à 170). Esta última fração, cujo teor protéico mostrou-se menor do que a fração TH-2c (figura 3), foi a origem das duas frações ("pools") 155 à 157 e 158 à 163, respectivamente, que após dialisadas e liofilizadas, resultaram então em atividade hemorrágica inferior à da fração 120 à 136, contrariando o esperado. Este fato constitui um indício de que durante a estocagem e/ou manipulação das frações hemorrágicas, a preservação da referida atividade parece ser favorecida de forma diretamente proporcional nas frações cujo teor protéico é superior.

Ainda a fração 120 à 136, foi a que apresentou maior rendimento (5.28%), com uma atividade hemorrágica elevada (958 cm²/mg) e um fator de purificação de 1.69. Também foi possuidora da maior atividade coagulante (índice de coagulação de 41.7 e fator de purificação de 5.42), e uma significativa atividade de L-aminoácido oxidase (2829 U/mg).

A maior atividade caseinolítica foi expressada pela fração PC-1 (7 à 9 do Sephadex G-100), com 426 U/mg, fator de purificação de 6.67, e com um rendimento de 1.58%. Ela também se mostrou com uma considerável atividade de L-aminoácido oxidase (2709 U/mg).

A fração 111-119 (tabela 7) foi a que apresentou a maior atividade de L-aminoácido oxidase quando medida pelo método colorimétrico, de 4873 U/mg, com um fator de purificação de 4.91.

Tabela 7: TABELA DE FRACIONAMENTO DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* EM GEL DE SEPHADEX G-100 E EM DEAE-CELULOSE *

Frações (tubos)	µg	A.H.E. (cm²/mg)	f.c. (cm²/mg)	I. P. (U/mg)	I. C.	LAO (U/mg)	F. P.	Rendimento	
								mg	%
Veneno Bruto	10	[344]	[344]				1,00	1000,00	100,00
	50			64			1,00		
	20				7,70		1,00		
	5					992	1,00		
G-100:									
(2-6)	13	637	288				2,21	6,80	0,68
				112			1,75		
(7-9)	15	564	271				2,08	15,80	1,58
				426			6,67		
					14,6		1,90		
						2709	2,73		
DEAE 10-18:									
(99-110)						1974	1,99	15,72	1,57
(111-119)					26,9		3,49	11,52	1,15
						4873	4,91		
(120-136)	5	958	566				1,69	52,78	5,28
				74			1,16		
					41,7		5,42		
						2829	2,85		
(155-157)				247			3,86	1,20	0,12
(158-163)	5	731	566				1,29	2,40	0,24
DEAE 19-26:									
(105-125)	5	684	566				1,21	30,48	3,05
					11,7		1,52		
(127-131)	5	974	566				1,72	12,88	1,29
					13,8		1,79		
(170-185)						1976	1,99	6,94	0,69

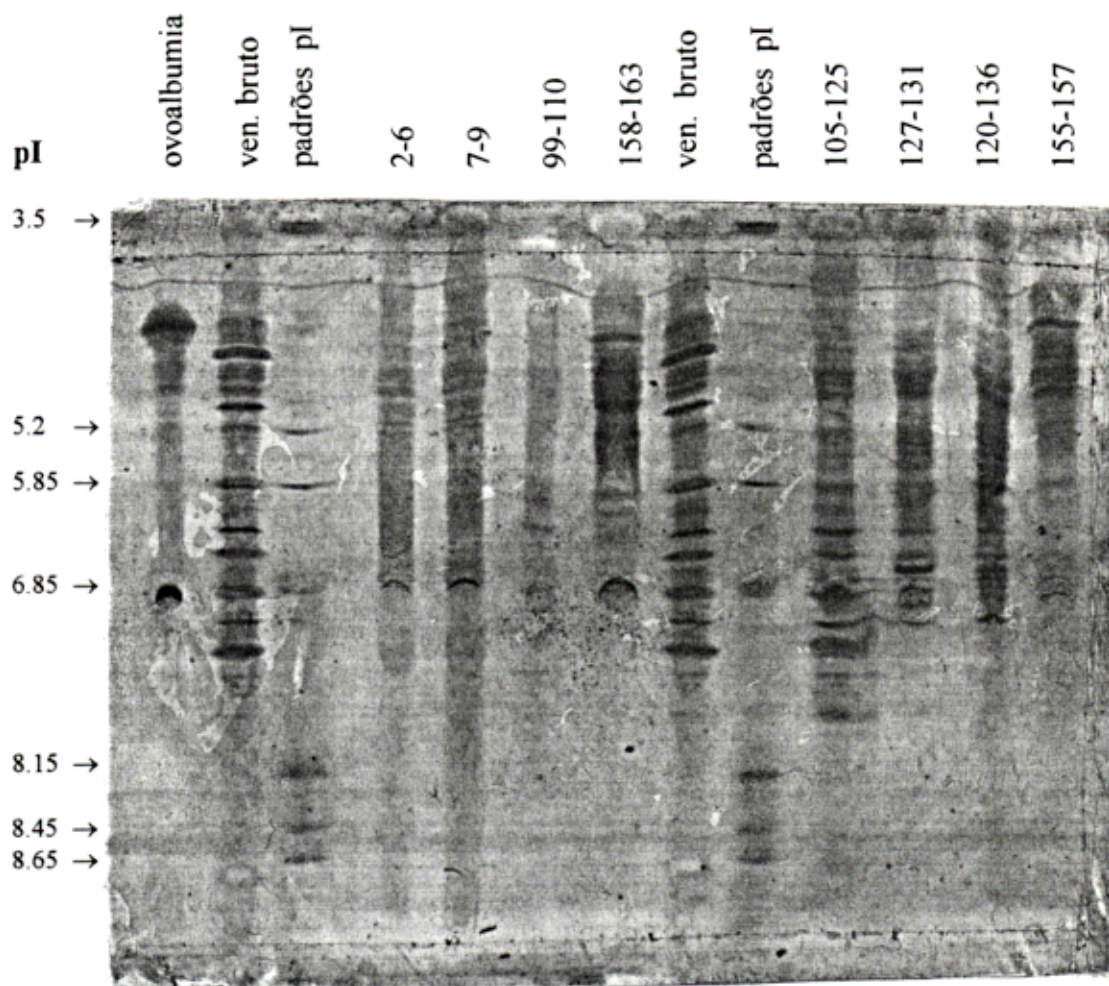
* µg: de proteína utilizada no experimento
A.H.E. = atividade hemorrágica específica (cm²/mg)
f.c. = fator de correção para a atividade hemorrágica
I.P. = índice proteolítico
I.C. = índice de coagulação
LAO = atividade específica de L-aminoácido oxidase
F.P. = fator de purificação

6.6. ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA* E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

6.6.1. IEF EM GEL DE POLIACRILAMIDA CORADA COM COOMASSIE

O gel de isoeletrofocalização, corado com *Coomassie Blue*, apresentou 36 bandas visualizadas no veneno bruto, sendo algumas delas muito acídicas (figura 16).

Esta técnica também foi útil para a avaliação do grau de pureza das frações cromatográficas, indicando que nenhuma delas foi purificada em alto nível.



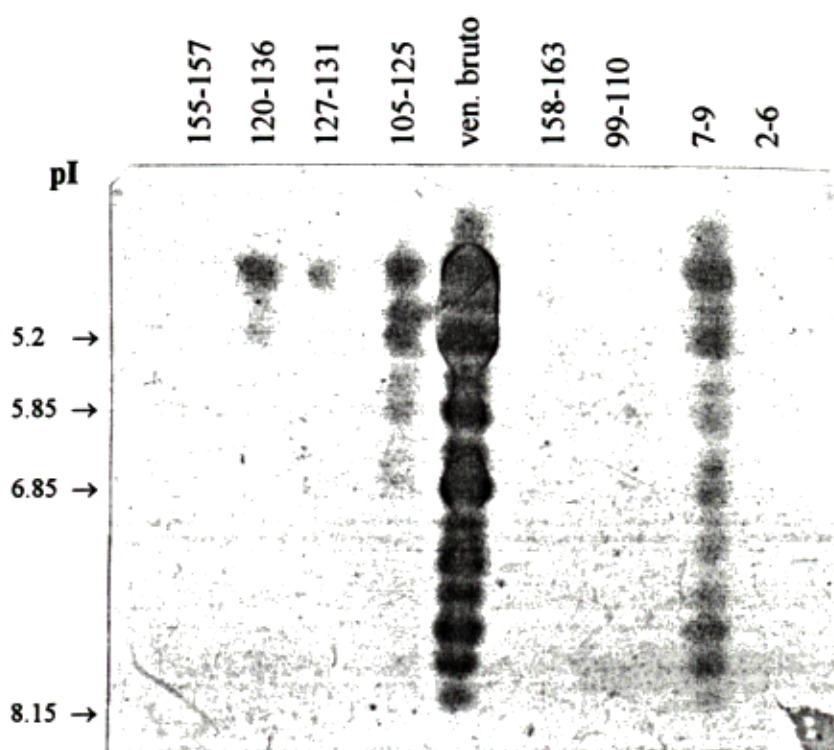
(-)

Figura 16: ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA* E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS, CORADAS COM *COOMASSIE BLUE*.

6.6.2. IEF ACOPLADA AO ZIMOGRAMA

O zimograma para a atividade de L-aminoácido oxidase do veneno bruto apresentou um número de 16 bandas ativas para LAO, quando a L-leucina foi utilizada como substrato, contra 36 bandas de proteínas coradas pelo *Coomassie Blue*. Estas bandas com atividade de LAO se posicionaram de uma forma contínua na faixa isoeletrica de 4 à 8.5, mas com uma predominância tanto de massa protéica quanto de atividade de LAO nos segmentos ácido e neutro (figura 17).

O número de isoenzimas para a LAO neste veneno mostrou-se grande e maior que o número de frações cromatográficas com atividade de LAO, ou seja, as isoenzimas todas não foram purificadas; ao contrário, algumas delas permaneceram juntas na mesma fração cromatográfica, como observado na fração 7 à 9. Por outro lado, as frações 120 à 136 e 127 à 131, mostraram fortes bandas ativas para LAO, posicionadas exclusivamente na região ácida, indicando um grau significativo de purificação para esta atividade (figura 17).



(-)
Figura 17: ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE, ACOPLADA À ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA, DO VENENO BRUTO E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA*.

É de se realçar que o perfil enzimático medido com L-leucina como substrato, pôde ainda ser mais enriquecido quando L-metionina foi utilizado como substrato para a LAO, resultando então em 18 bandas enzimáticas perfeitamente distinguíveis (figura 18).

Esta técnica foi útil em fornecer um perfil consistente dos componentes do veneno de *Bothrops cotiara* com atividade de LAO, embora apenas qualitativo, se mostrando uma ferramenta útil na caracterização de LAO em diferentes frações e venenos, além de também poder ser usada para testar diferentes substratos.

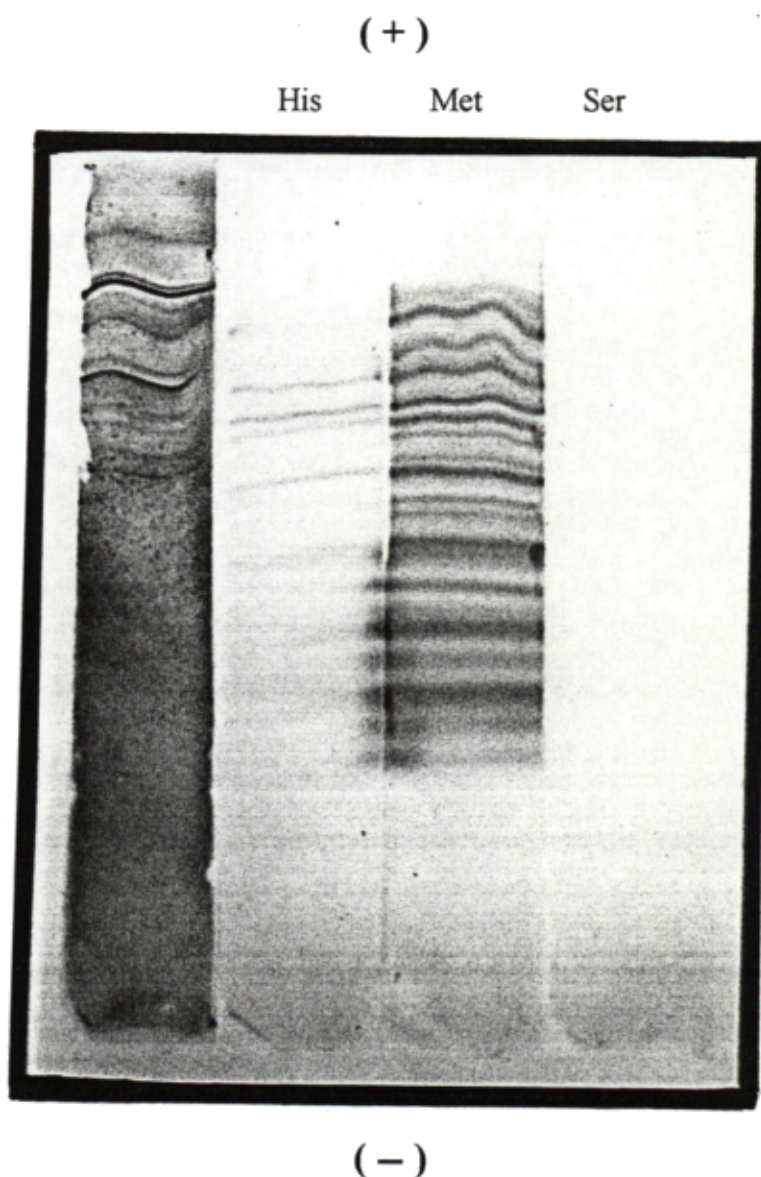


Figura 18: ZIMOGRAMA DA ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE, ACOPLADA À ISOELETROFOCALIZAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA, DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*, UTILIZANDO L-HISTIDINA, L-METIONINA E L-SERINA COMO SUBSTRATOS.

6.7. FRACIONAMENTO DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (H.P.L.C.)

6.7.1. UTILIZANDO COLUNA DE TROCA IÔNICA

Utilizando a coluna de troca iônica DEAE 5PW (7.5 mm x 7.5 cm), a corrida cromatográfica mostrou um perfil complexo, com 21 picos protéicos, com tempos de retenção (RT) variando entre 2.57 e 35.25 minutos, eluídas com a força iônica determinada pela faixa de salina desde 20 até 380 mM (figura 19).

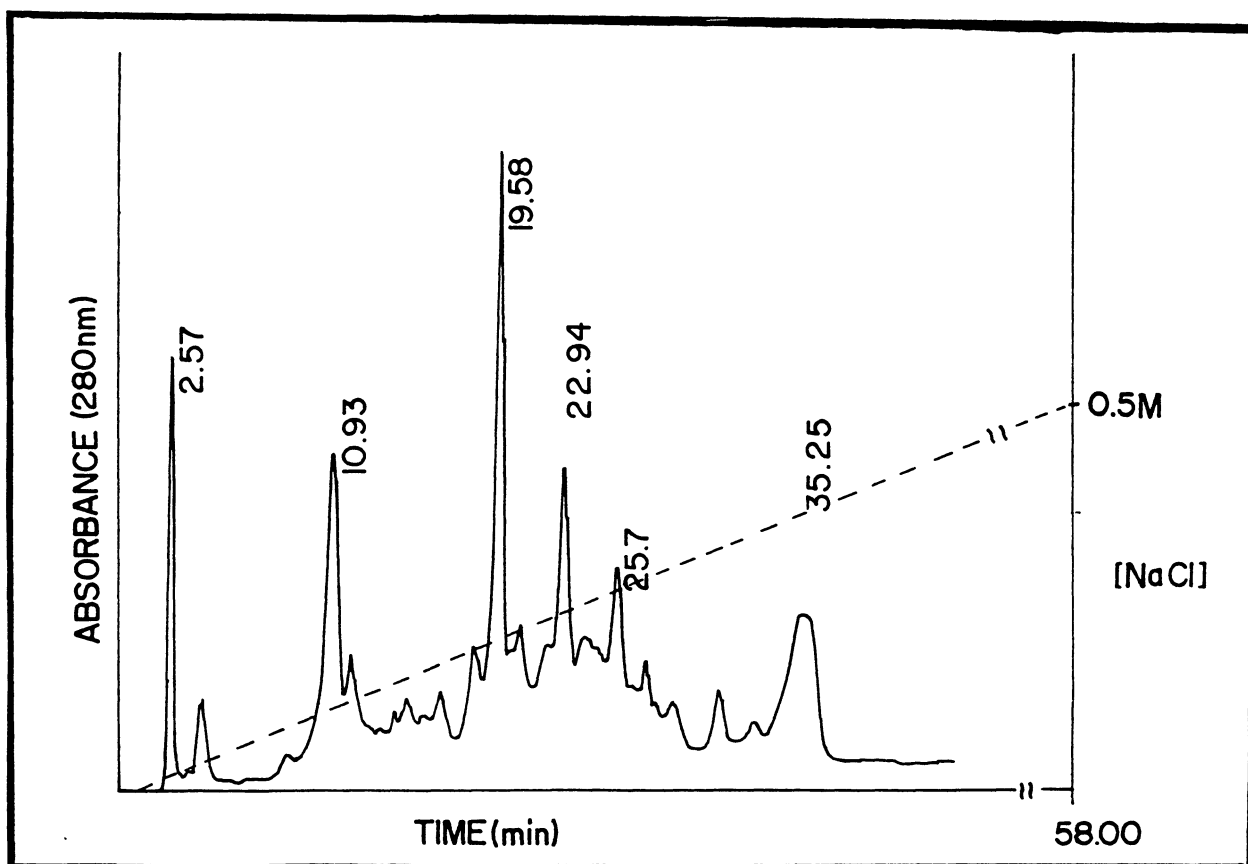


Figura 19: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (H.P.L.C.) DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*, EM COLUNA DE TROCA IÔNICA DEAE 5PW.

6.7.2. UTILIZANDO COLUNA DE FILTRAÇÃO EM GEL

Para se ter uma visão do perfil peptídico do veneno de *Bothrops cotiara*, uma coluna de filtração em gel (PROTEIN PAK 60, de 7,8 mm x 30 cm), com intervalo de fracionamento para pesos moleculares abaixo de 20.000, foi utilizada.

Uma amostra de veneno (200 μ g em 20 μ l de tampão Tris-HCl 50 mM.pH 7.5), previamente filtrada, foi eluída com o mesmo tampão, à uma velocidade de fluxo de 0.75 ml/min e com uma pressão de 550 psi.

Como previsível da experimentação com Sephadex G-100, a quase totalidade da massa protéica foi excluída no V_0 (volume morto). Todavia, na faixa útil de fracionamento, e mesmo além inclusão máxima, a coluna facultou a detecção de 18 picos com peso molecular menor que 20.000 no veneno de *Bothrops cotiara*, o que recomenda um estudo mais aprofundado desta investigação. Os tempos de retenção (RT) variaram entre 7.84 (volume morto) e 34.54 minutos, sendo que os 3 picos maiores foram eluídos, respectivamente, em 12.88, 14.22 e 16.38 minutos (figura 20).

A soro albumina bovina (B.S.A.) e o aspartame (L-aspartil-L-fenilalanina metil éster), nas concentrações de 5 mg/ml, com velocidade de fluxo de 0.5 ml/min e com uma pressão de 480 psi, no mesmo tampão de corrida, foram utilizados como padrões de volume morto e de amostra no intervalo de fracionamento, respectivamente. O B.S.A. (PM= 66.000) foi eluído com 7.24 minutos, e o aspartame (PM= 294,3) foi eluído com 13.54 minutos de corrida (dado não mostrado).

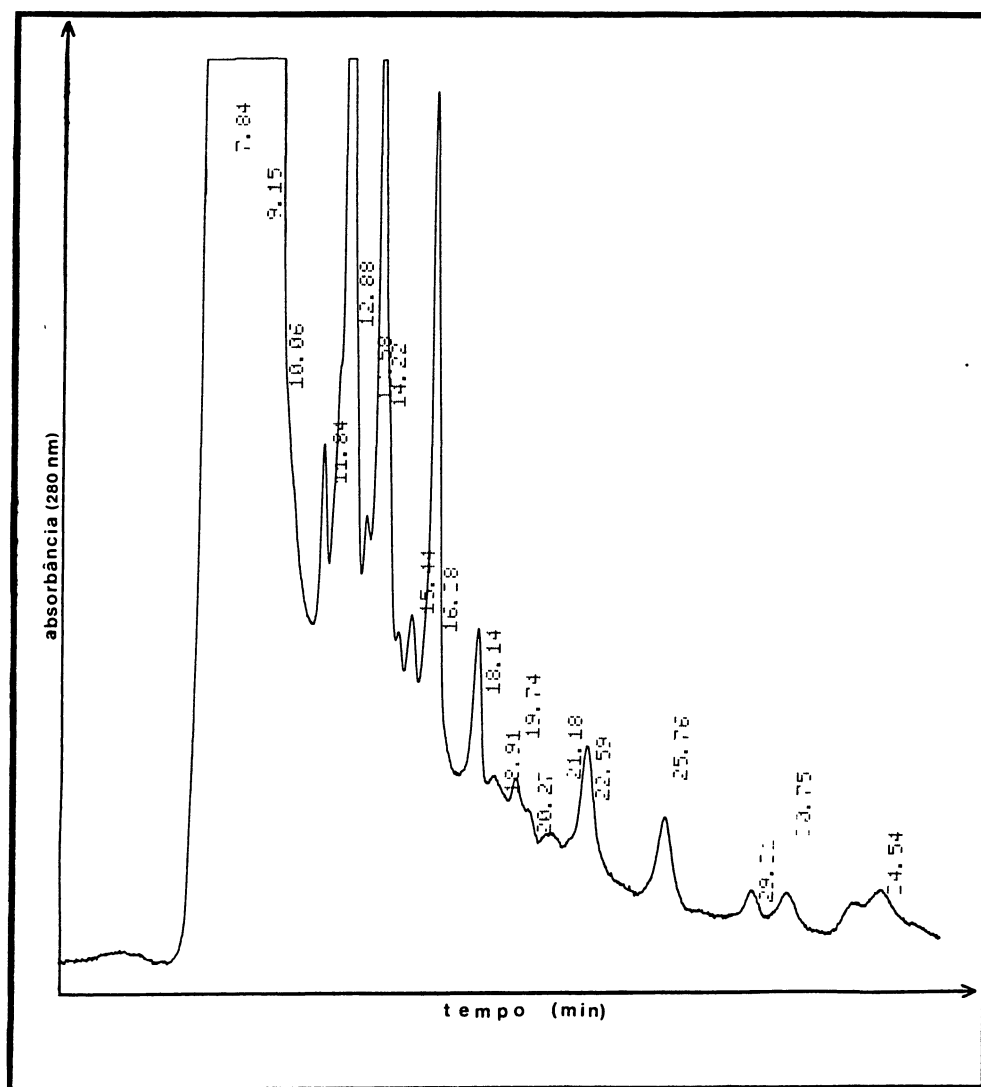


Figura 20: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (H.P.L.C.) DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*, EM COLUNA DE PERMEACÃO EM GEL Protein Pak 60

6.8. FRACIONAMENTO DO VENENO DE *BOTHROPS COTIARA* POR ELETROFORESE CAPILAR

A figura 21 mostra o perfil de corrida do veneno de *Bothrops cotiara* sob várias condições experimentais. A figura 21-A se trata de uma corrida realizada com um potencial (E) de 10 kV, uma corrente (i) de 69 μ A e tampão fosfato 0.1M. Ao se variar o tampão para citrato 0.02 M pH 3.9, com um potencial de 10 kV e corrente em torno de 25 μ A, o perfil se mostrou mais resolvido, se detectando 8 picos protéicos (figura 21-B). Com

um aumento do potencial para 18 kV e corrente para 27 μA , o número de picos, e consequentemente a resolução, aumentou para 11 (figura 21-C). Já a alteração do potencial para 24 kV, e consequentemente uma corrente também maior (de 83 μA), aumentou ainda mais a resolução, se obtendo 29 picos protéicos (figura 21-D), nos tempos de retenção entre 6 e 16.5 minutos.

Este perfil geral ainda pode ser melhorado, se variando as condições de potencial e corrente aplicados, concentração e pH do tampão, concentração de *zwiterion* e soluções eletrolíticas.

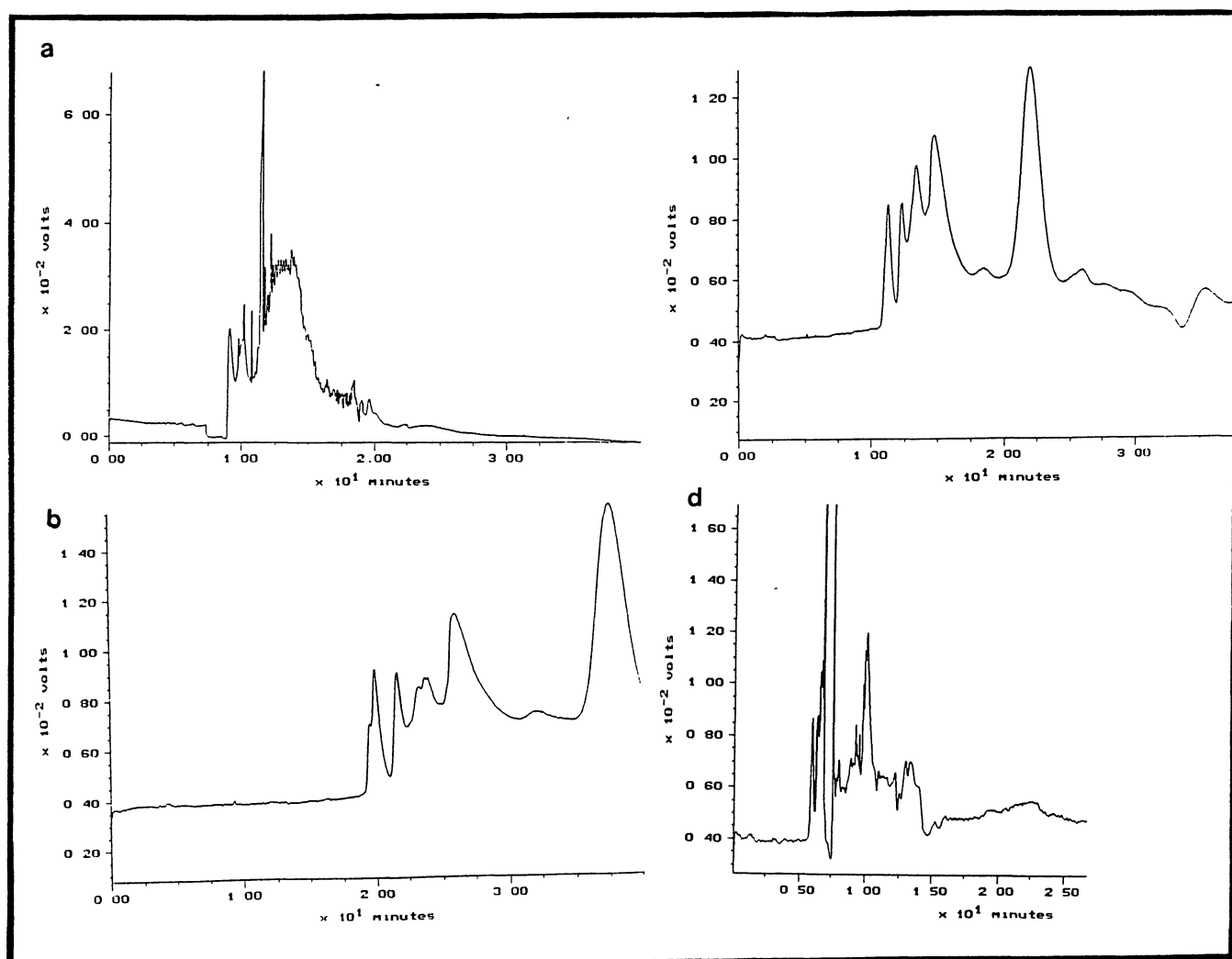


Figura 21: ELETROFORESE CAPILAR DO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS COTIARA*, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES A) Amostra do veneno em tampão fosfato 0,1 M, $E = 10 \text{ kV}$, $i = 69 \mu\text{A}$. B) Amostra do veneno em tampão citrato 0.02 M pH 3.9, $E = 10 \text{ kV}$, $i = 25 \mu\text{A}$ C) Amostra do veneno em tampão citrato 0.02 M pH 3.9; $E = 18 \text{ kV}$; $i = 27 \mu\text{A}$. D) Amostra do veneno em tampão citrato 0.02 M pH 3.9, $E = 24 \text{ kV}$, $i = 83 \mu\text{A}$.

7. DISCUSSÃO

O veneno de *Bothrops cotiara* é deveras interessante por suas particularidades. Enquanto preparação bruta, ele possui um dos menores teores protéicos dos venenos botrópicos estudados, uma das menores atividades hemorrágica e proteolítica sobre a caseína, e uma das maiores atividades coagulante "thrombin-like" (FURTADO e cols., 1991). Além disto, sua forte coloração amarelada sugere uma alta atividade de L-aminoácido oxidase (BARON, 1993).

Por outro lado, a caracterização de venenos botrópicos de serpentes brasileiras, fracionados por FPLC (LEITE e cols., 1992), demonstrou no veneno de *Bothrops cotiara*, depois do fracionamento, tres picos protéicos com forte atividade hemorrágica, possuindo um deles a maior atividade hemorrágica dentre todos os venenos testados.

Por isto, a caracterização bioquímica das toxinas hemorrágicas presentes neste veneno poderia contribuir para o entendimento da razão pela qual este veneno bruto se apresenta como pouco hemorrágico quando, no entanto, ao ser fracionado, exhibe uma atividade hemorrágica superior a dos outros venenos botrópicos brasileiros testados.

Da mesma forma a determinação da presença de isoenzimas de L-aminoácido oxidase no veneno de *Bothrops cotiara*, nunca registrada até o presente momento, poderia indicar que esta enzima particular está relacionada com a ação tóxica do veneno, já que a desaminação oxidativa de aminoácidos pela LAO pode representar uma ação complementar para a atividade de qualquer enzima proteolítica também presente no veneno (PESSATTI e cols., 1995).

Assim, utilizando técnicas de permeação em gel de Sephadex G-100 e troca iônica em DEAE-celulose, o veneno de *Bothrops cotiara* foi fracionado, e as atividades hemorrágica, proteolítica sobre a caseína, de L-aminoácido oxidase e coagulante das frações foram determinadas.

As frações hemorrágicas (TH) do veneno de *Bothrops cotiara*, em número de 9, de modo geral foram obtidas com um baixo rendimento. A fração correspondente aos tubos 2 à 6 (TH-1), foi obtida com um rendimento final de 0.68% (tabela 7), e apresentou a atividade hemorrágica 2.21 vezes maior que a do veneno bruto. A fração de maior rendimento final foi correspondentes aos tubos 120 à 136, com 5.28%, ainda considerado um valor baixo. Estes valores se assemelham aos obtidos por XU e cols. (1981), JOHNSON & OWNBY (1990), SÁNCHEZ e cols. (1991), TAN & PONNUDURAI (1991) e outros, embora com um grau de pureza muito superior aos obtidos neste trabalho.

Uma classificação das TH(s). de acordo com seus pesos moleculares foi proposta por BJARNASON & FOX (1988/89): classe I, para as pequenas TH(s)., com peso molecular entre 20 e 30 kDa; classe II, para as toxinas de médio peso molecular, entre 30 e 60 kDa; e classe III, para as toxinas de alto peso molecular, tendo entre 60 e 100 kDa, as maiores e mais potentes toxinas hemorrágicas. Desta forma, a fração TH-1, obtida do veneno de *Bothrops cotiara* por permeação em gel de Sephadex G-100, e apresentando peso molecular entre 50 e 100 kDa, seguindo o critério de padrões de peso molecular na mesma coluna, se classificaria como uma TH de médio a alto peso molecular. Esta classificação também se enquadra na proposta por KINI & EVANS (1992), a qual é baseada não apenas nos pesos moleculares de metaloproteinases, mas simultaneamente nos prováveis domínios estruturais. Segundo esta classificação, as metaloproteinases hemorrágicas de alto peso molecular (entre 80 e 100 kDa) provavelmente têm os 4 domínios estruturais possíveis de uma metaloproteinase. As outras toxinas hemorrágicas do veneno de *Bothrops cotiara* provavelmente se enquadram na classe II, já que foram obtidos a partir das frações TH-2 e TH-3, com pesos moleculares na faixa de 30 à 40 kDa.

A inibição de metaloproteinases por peptídeos endógenos tem sido investigada desde 1966, quando KATO e cols. isolaram 2 tripeptídeos com esta atividade inibidora em vários venenos, inclusive em *Bothrops jararaca*; depois, outros autores também isolaram pequenos peptídeos inibidores (LO, 1972; OKADA, 1974). O isolamento destes

mesmos 2 tripeptídeos foi repetido por FRANCIS & KAISER (1993), no veneno de *Bothrops asper*. Segundo os autores, estes mesmos tripeptídeos estão presentes em vários venenos *Viperidae* e *Crotalidae*, e são provavelmente os inibidores das metaloproteinases nos venenos.

A função destes inibidores endógenos é tornar as enzimas inativas enquanto na glândula de veneno; como exemplo, a fosfolipase A₂ é inibida pela alta concentração de citrato presente nos venenos (FRANCIS e cols., 1992), ou por polipeptídeos inibidores específicos (BRAGANÇA e cols., 1970; VIDAL & STOPPANI, 1971). Em outro modelo de interação molecular, as metaloproteinases hemorrágicas também precisam ser inibidas enquanto na glândula de veneno, para não degradarem as proteínas do veneno e da própria glândula. Depois da inoculação do veneno estes tripeptídeos são clivados, e as metaloproteinases dissociadas iniciam sua atividade (FRANCIS & KAISER, 1993).

Por ser uma metaloproteinase, a presença do íon Zn²⁺ no veneno de *Bothrops cotiara* na concentração determinada, de 990 µg de metal por grama de veneno bruto, é concordante com o teor deste elemento em venenos crotálicos, e muito maior do que em venenos elapídicos (FRIEDERICH & TU, 1971).

Os venenos de serpentes *Crotalidae* são reconhecidos pela sua abundância em enzimas proteolíticas. Apesar das dificuldades de se purificar estas enzimas, bem como de se estabelecer ou não sua relação com as toxinas hemorrágicas, ao longo do tempo se concluiu que ambas são metaloproteinases zinco-dependentes de uma única natureza (BJARNASON & FOX, 1988/89), embora as respectivas ações levassem a padrões de digestão de componentes da membrana basal claramente diferentes (HITE e cols., 1992).

No entanto, a principal metodologia utilizada para a determinação desta atividade (KUNITZ, 1947), a qual utiliza a caseína como substrato, apresenta algumas limitações que não devem passar despercebidas.

As toxinas hemorrágicas possuem sítios de ação extremamente específicos, o que as tornam altamente seletivas com relação à estrutura primária do substrato; conseqüentemente, um número reduzido de ligações peptídicas da caseína devem ser clivados. Ainda, o monitoramento da atividade se realiza pela leitura do sobrenadante à

280 nm, o que diminui mais a sensibilidade do método. Destarte, a qualidade de ação enzimática, requereria técnicas que produzissem um mapeamento peptídico, por exemplo, processamento eletroforético.

Por isto, a dificuldade de se concluir a relação entre as TH(s). e as enzimas proteolíticas do veneno de *Bothrops cotiara*. Somente o que se pode afirmar é que algumas das TH(s). isoladas apresentaram uma concomitante atividade proteolítica sobre a caseína, à exemplo das frações TH-2a e TH-2d (figuras 3 e 8). Mas das TH(s). que não apresentaram esta atividade sobre a caseína, resta a dúvida se elas não seriam dotadas de atividade proteolítica sobre substratos mais específicos, como componentes isolados da membrana basal (colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, nidógeno e outros).

Assim, a afirmação de que uma toxina hemorrágica é ou não proteolítica, embasada puramente nesta metodologia, seria hoje infundada.

Com relação à L-aminoácido oxidase, o rendimento total de 10 % pode ser considerado adequado pelo grau de purificação atingido, já que os rendimentos obtidos por WELLNER & MEISTER (1960) e TAN & SAIFUDDIN (1991), foram menores (3 e 2%, respectivamente), embora com uma pureza muito maior. O mesmo não pode ser afirmado se comparando este resultado ao obtido por SÁNCHEZ & MAGALHÃES (1991), do veneno de *Lachesis muta muta*: 38.4% de rendimento, com um fator de purificação de 72.

O substrato utilizado para os experimentos de determinação da atividade de L-aminoácido oxidase no veneno de *Bothrops cotiara*, o aminoácido L-leucina, foi eficientemente desaminado por mecanismo oxidativo, como anteriormente verificado por ZELLER & MARITZ (1945). A L-metionina revelou-se um substrato ainda melhor. Na concentração de 2 mM, este aminoácido proporcionou uma atividade à L-aminoácido oxidase 4% maior que para a L-leucina. Também se prestaram como substrato o L-triptofano e a L-fenilalanina, e em menor grau a L-cistina, a L-histidina, a L-tirosina, a L-isoleucina e a L-cisteína como observado na tabela 6.

Esta diferença de afinidade das L-aminoácido oxidases do veneno de *Bothrops cotiara* pelos substratos seria explicável pela estéreo-especificidade da enzima (TAN &

SAIFUDDIN, 1991). Comparando a especificidade da L-aminoácido oxidase do veneno de *Ophiophagus hannah* para L-leucina e N-acetil-L-leucina, os autores verificaram que o primeiro substrato era oxidado mais eficientemente, devido a presença de um grupo α -amino primário livre, requerido para uma boa atividade. No caso dos 2 melhores substratos, L-metionina e L-leucina, o caráter hidrofóbico do grupamento R é basicamente modificado apenas pela presença do elemento enxofre.

Para as L-aminoácido oxidases de venenos, os melhores substratos geralmente são L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, enquanto L-lisina, L-serina, L-treonina, L-asparagina e L-glutamina são fracamente ou não são atacados (TAN & SAIFUDDIN, 1991). Portanto, a especificidade pelos substratos é determinada também pelo tamanho da cadeia R do aminoácido, além de sua polaridade ou hidrofobicidade.

A participação de uma coenzima na atividade catalítica da L-aminoácido oxidase de venenos foi primeiramente observada e caracterizada por ZELLER & MARITZ (1945), como sendo a flavina adenina dinucleotídeo. Quando analisado espectrofotometricamente de 200 à 700 nm, o veneno de *Bothrops cotiara* apresentou dois picos maiores de absorção, em 390 e 465, correspondendo efetivamente aos observados numa solução pura de FAD (figura 18). Este achado é concordante com o de vários autores (ZELLER & MARITZ, 1945; WELLNER & MEISTER, 1960; KURT & AURICH, 1973; SÁNCHEZ & MAGALHÃES, 1991). O terceiro pico característico do FAD, a 290 nm, ficou, obviamente, mascarado pela absorção da ligação peptídica.

As isoenzimas de LAO fracionadas e parcialmente purificadas do veneno de *Bothrops cotiara*, se mostraram com pesos moleculares abaixo de 100 kDa, segundo o critério de permeação em gel de Sephadex G-100 e utilização de padrões de peso molecular, valores diferentes dos normalmente encontrados em L-aminoácido oxidases purificadas de venenos de outras serpentes, que possuem pesos moleculares entre 130 e 142 kDa (WELLNER & MEISTER, 1960; DEKOK & RAWITCH, 1990; STILES e cols., 1991; SÁNCHEZ & MAGALHÃES, 1991).

O zimograma para a L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara*

apresentou várias isoenzimas (figura 17), sugerindo que as bandas observadas, apesar de algumas em pequena intensidade, realmente são diferentes entidades protéicas. Em verdade, considerando-se a ampla faixa de pontos isoeletricos observados, poder-se-ia pensar em blocos ou conjuntos de isoenzimas.

Este fato tem sido verificado em várias outras espécies como: *Crotalus adamanteus* (WELLNER & MEISTER, 1960; DEKOK & RAWITCH, 1969), *Trimeresurus flavoviridis* (NAKANO e cols., 1972), *Vipera palestinae* (SHAHAM & BDOLAH, 1973) e *Bothrops asper* (UMAÑA, 1982).

Ao contrário, investigações com os venenos de *Agkistrodon piscivorus* (SINGER & KEARNEY, 1950), *Agkistrodon caliginosus* (SUGIURA e cols., 1975) e mais recentemente de *Naja naja kaouthia* (TAN & SAIFUDDIN, 1991) e de *Lachesis muta muta* (SÁNCHEZ & MAGALHÃES, 1991), concluíram que eles não possuem isoenzimas, baseados no aparecimento de apenas uma banda em eletroforese em gel de poliacrilamida e em isoeletroforese.

A razão da existência da L-aminoácido oxidase em venenos tem sido discutida há muito tempo. Segundo ZELLER (1948), as enzimas dos venenos possuem ou funções digestivas, ou efeitos tóxicos, ou ambos. A L-aminoácido oxidase seria uma enzima digestiva, justamente por facilitar a degradação dos aminoácidos previamente liberados pela ação das enzimas proteolíticas, ou seja, alterando, irreversivelmente, a estrutura das unidades monoméricas.

Mais especificamente, para a existência de isoenzimas de L-aminoácido oxidase, há várias especulações, envolvendo o número e posição dos grupos amida, e composição de carboidratos (DEKOK & RAWITCH, 1969).

A técnica de zimograma para a determinação da atividade de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops cotiara*, foi útil em fornecer um perfil consistente dos componentes do veneno com esta atividade, embora apenas qualitativa, se mostrando uma ferramenta eficiente e segura na caracterização de LAO em diferentes frações e venenos, além de também poder ser usada para testar diferentes substratos para as várias isoenzimas.

Ao se tentar relacionar as toxinas hemorrágicas e as L-aminoácido oxidases, se observou uma relação de exclusão entre ambas atividades, ou seja, embora sempre muito próximas, os picos de atividade das L-aminoácido oxidases normalmente se mostraram como entidades protéicas diferentes das toxinas hemorrágicas.

Este fenômeno também foi verificado com a toxina hemorrágica HR1, isolada do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, a qual depois de purificada se mostrou desvinculada das atividades proteolítica e de L-aminoácido oxidase (OSHIMA e cols., 1972).

No veneno de *Bothrops cotiara*, esta relação de exclusão entre as toxinas hemorrágicas e de L-aminoácido oxidase pôde ser observada em várias frações, a exemplo da fração TH-1 que praticamente não apresentou atividade de LAO (figura 17), e no pico com grande atividade de L-aminoácido oxidase, que posicionou-se entre as frações TH-3a e TH-3b, após eluição da fração 19 à 26 do Sephadex G-100 na coluna de DEAE-celulose (figuras 4 e 14).

Portanto, o que se pode concluir é que estas atividades são geralmente excludentes e provavelmente sinérgicas, já que a LAO pode influenciar a atividade proteolítica do veneno e a atividade de proteases de extratos de tecidos (ZELLER, 1948).

Os venenos botrópicos induzem à uma ampla variedade de efeitos na coagulação, ativando fatores da cascata, interferindo com a função plaquetária e causando danos aos vasos sanguíneos (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989). Devido a conhecida e elevada atividade coagulante tipo trombina do veneno de *Bothrops cotiara* (FURTADO e cols., 1991), é que a determinação desta atividade fez parte dos experimentos realizados com as frações cromatográficas.

Utilizando uma metodologia clássica (THEAKSTON & REID, 1983), foram detectados no veneno de *Bothrops cotiara*, 9 proteases tipo trombina, tendo o fibrinogênio como substrato, com fatores de purificação entre 1.52 e 5.42 (tabela 7). Este número de picos com esta atividade foi surpreendente e diferente do observado por LEITE e cols. (1992), que ao fracionarem o mesmo veneno por F.P.L.C., obtiveram apenas 1 pico com atividade coagulante.

Os rendimentos do processo de purificação para esta atividade margearam 1.5%, se destacando no entanto uma das enzimas, presente nas frações 120 à 136 da DEAE-celulose 10-18, que manifestou o maior rendimento (5.28%) e a maior atividade coagulante deste veneno (tabela 7). Esta fração (Ac-c) se apresentou contaminada com atividade de LAO, e coincidiu com a fração hemorrágica TH-2c. Mais uma etapa de purificação seria necessária para separar esta enzima coagulante da LAO, e para se investigar a possibilidade de serem ambas (enzima coagulante e TH-2c) o mesmo componente, ou para se atingir a separação e a purificação total delas.

A outra enzima coagulante de destaque, a única verificada na DEAE-celulose 19 à 26, representada pela fração 127 à 131 (tabela 7), também apresentou atividade hemorrágica simultânea. Da mesma forma, para se verificar a hipótese de ambas atividades serem inerentes à um mesmo componente, seria necessário mais uma etapa de purificação, com monitoramento por eletroforese em gel de poliacrilamida ou isoeletrofocalização.

Normalmente estas enzimas coagulantes diferem da enzima proteolítica de caseína presentes nos venenos, por algumas propriedades, como não serem inibidas pelo íon Cd^{2+} , maior termo-estabilidade e pH ótimo (Henriques e cols., 1960).

No entanto, neste veneno foi observado um componente protéico (frações 50 à 55 da DEAE-celulose 10-18), acumulando não apenas atividades coagulante e caseinólítica, mas também atividades hemorrágica (fração hemorrágica TH-2a) e de L-aminoácido oxidase. Esta entidade não se destacou por nenhuma destas atividades elevadas, mas por reunir e manter agregadas todas elas simultaneamente (figuras 3, 8, 10 e 13).

Como determinado por NAHAS e cols. (1979), este veneno, igualmente aos venenos de *B. asper*, *B. itapetimingae* e *B. fonsecai*, possui uma atividade coagulante específica de ativador "thrombin-like" e de pró-trombina, e é desprovido da atividade ativadora do fator X.

Desta forma, foram verificadas no veneno de *Bothrops cotiara*: cerca de 9 toxinas hemorrágicas, sendo 6 delas mais significativas; 8 enzimas proteolíticas sobre a caseína; 12 isoenzimas de L-aminoácido oxidase, determinadas pelos métodos de permeação em

gel e cromatografia de troca iônica, e em torno de 16 isoenzimas de LAO, determinadas pelo zimograma da isoeletrofocalização; e, finalmente, em torno de 9 frações coagulantes "thrombin-like".

É indiscutível a contribuição que as técnicas eletroforéticas têm dado para a análise de biomoléculas.

A eletroforese capilar (E.C.) se trata de um avanço no método eletroforético por reunir vantagens de ambas as técnicas: eletroforese e cromatografia. As características físicas dos capilares da E.C., com diâmetros variando entre 20 e 100 μm , conferem uma alta relação superfície:volume (em torno de 70 vezes maior que uma placa de gel de poliacrilamida usual) e os fazem ideais como um canal de migração para a separação eletroforética (LANDERS, 1993). Destarte, se torna possível a aplicação de voltagens elevadas, já que o calor gerado é dissipado mais eficientemente, reduzindo o tempo de separação (corrida) para minutos. Por isto, esta técnica foi de grande utilidade para a confirmação da complexidade deste veneno.

Não obstante os efetivos graus de fracionamento atingidos para as várias atividades enzimáticas medidas, persiste a necessidade de aplicação de outras técnicas bioquímicas, tais como, por exemplo, eletroforese preparativa (com gradiente de sorbitol), ultrafiltração (com membranas *cut-off*), cromatografia de afinidade e eletroforese em gel de poliacrilamida, com o feito de se atingir a completa purificação dos componentes do veneno de *Bothrops cotiara*.

8. CONCLUSÕES

a) As técnicas de permeação em gel de Sephadex G-100 e de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose com gradiente salino, se mostraram efetivas para fracionar o veneno de *Bothrops cotiara*.

b) A determinação da atividade hemorrágica através de injeção intra-dérmica do veneno e das frações cromatográficas, permitiu a diferenciação de 9 frações hemorrágicas, denominadas: TH-1, TH-2a, TH-2b, TH-2c, TH-2d, TH-2e, TH-3a, TH-3b e TH-3c. Com relação ao veneno bruto (A.H.E. = 259 cm²/mg), estas frações foram purificadas de 1.21 à 2.21 vezes. O íon zinco (990 µg de Zn²⁺/g de veneno), determinado por espectrofotometria de absorção atômica, deve, a exemplo do já relatado para outros venenos de serpentes, integrar as metaloproteínas com atividade hemorrágica.

c) Foram obtidas 8 frações proteolíticas sobre a caseína, denominados PC-1 (7-9), PC -a, -b, -c, -d, -e, PC-4 e PC-5, com fatores de purificação de 1.16 até 6.67 vezes. Este último valor, atingido pelo PC-1, foi o máximo obtido no conjunto de todas as atividades enzimáticas medidas.

d) Foram obtidas 9 frações com atividade coagulante "thrombin-like", designadas AC-3, AC-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g e -h. O maior enriquecimento obtido (IC= 41.7) em relação ao veneno bruto (IC = 7.7) ocorreu no conjunto dos tubos 120 à 136, derivado das sub-frações AC-c e AC-d, o qual apresentou também o maior rendimento (5.28%).

e) Pelas técnicas cromatográficas foram obtidas 12 frações isoenzímicas de L-aminoácido oxidase. Na atividade de LAO do veneno bruto, além da L-leucina, foram ensaiados outros L-aminoácidos como substratos e a atividade, em ordem decrescente, foi: metionina, leucina, triptofano e fenilalanina. Menor atividade foi verificada com cistina, histidina, tirosina, isoleucina e cisteína.

f) Maior resolução para o conjunto de isoenzimas para a LAO foi obtida acoplando-se a isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida (pI 3.5-9.5), com o zimograma revelado com L-leucina ou L-metionina. Para as 36 bandas protéicas reveladas com *Coomassie Blue*, corresponderam 16 ou 18 bandas de isoenzimas de LAO, respectivamente.

g) Tanto a troca iônica na modalidade de alta resolução (HPLC) quanto a eletroforese capilar de alta voltagem se mostraram úteis na confirmação da micro-heterogeneidade molecular da população protéica do veneno de *Bothrops cotiara*. No primeiro caso foram detectados 21 componentes com absorvância à 280 nm e no segundo, 29 componentes usando-se 24 kVolts e gerada uma corrente de 83 μ A.

9. BIBLIOGRAFIA

AISAKA, K.; TERADA, O. Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 45, n. 10, p. 2311-2316, 1981.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Cli. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

ANDREWS, A. T. **Electrophoresis: theory, techniques and bioquimical and clinical applications**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1987.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Toxicon**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 691-706, 1985.

BARON, M. Anais do II Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná (EVINCI - 94), Curitiba, abril de 1994.

BEITZ, D. C.; ALLEN, R. S. Metabolismo das proteínas e aminoácidos. In: SWENSON, M. J. **Dukes. Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S. A., 1988. p. 353-364.

BJARNASON, J. B.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin *e*. **Biochemistry**, Washington, v. 17, p. 3395-3403, 1978.

- BJARNASON, J. B.; HAMILTON, D; FOX, J. W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by free proteolytic hemorrhagic toxin from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, Berlin, v. 369, p. 121-129, 1988, Suppl.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, Orono, v. 7, n. 2, p. 121-129, 1988-89.
- BLANCHARD, M.; GREEN, D. E.; NOCITO, V.; RATNER, J. **J. Biol. Chem.**, v. 155, p. 421, 1944.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 1137-1150, 1993.
- BOQUET, P. Venins de serpents. Physio-pathologie de l'evenimation et proprietes biologiques des venins. **Toxicon**, Oxford, v. 2, p. 5-41, 1964.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGANÇA, B. M.; SAMBRAY, Y. M.; SAMBRAY, R. Y. Isolation of polypeptide inhibitor of phospholipase A from cobra venom. **Eur. J. Biochem.**, New Jersey, v. 13, p. 410-415, 1970.
- CROXATTO, H. Hypertensinase activity of an L-amino acid oxidase preparation and of the venom of *Bothrops neuwiedii*. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.**, New York, v. 62, p. 146-149, 1946.

- CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 243, n. 9, p. 2302-2314, 1968.
- DAWSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H.; JONES, K. M. **Data for Biochemical Research**. ed.3 .Oxford: Clarendon Press, 1991. 580 pp.
- DEKOK, A.; RAWITCH, A. B. Studies of L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. **Biochemistry**, Washington , v. 8, p. 1405-1411, 1969.
- DENSON, K. W. E. The preparation of general reagents and coagulation factors. In: BIGGS, R. **Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis**. Oxford: Black Well, 1972. p. 587-675.
- EAGLE, H. The coagulation blood by snake venoms and its physiologic significance. **J. Exp. Med.**, New York, n. 65, p. 613-39, 1937.
- EICHBAUM, F. W. Ação dematotóxica de venenos ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 20, p. 79-94, 1947.
- FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis and toxicity. **Univ. Penn. Med. Bull.**, v. 15, p. 354, 1902.
- FRANCIS, B.; SEEBART, C.; KAISER, I. I. Citrate is endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. **Toxicon**, Oxford, v. 30, p. 1239-1246, 1992.
- FRANCIS, B.; KAISER, I. I. Inhibition of metaloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 889-899, 1993.

- FRIEDERICH, C. & TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharm.**, New York, v.20, p. 1549-1556, 1971.
- FURTADO, M.F.D.; COLLETO, G. M. D. D.; DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.
- GONÇALVES, L. R. C. **Hemorragia local induzida experimentalmente pelo veneno de serpentes *Bothrops jararaca***: participação de fatores endógenos do tecido lesado. São Paulo, 1993. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- GRABAR, W.; WILLIAMS, C. A. Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 17, p. 67, 1955.
- GROTTO, L.; MOROZ, C.; de VRIES, A.; GOLDBLUM, N. Isolation of *Vipera palestinae* hemorrhagin and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 133, p. 356, 1967.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTLLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, Oxford, v. 19, p. 493-500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L.; ARROYO, O.; ROJAS, E.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A. Pathogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la

serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). **Acta Méd. Costarric.**, San José, v. 25, p. 225-262, 1982.

GUTIÉRREZ, J.M.; GENE, J.A. ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, Oxford, v. 23, p. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 51, n 4, p. 211-223, 1989.

HENRIQUES, O. B.; FICHMAN, N.; HENRRIQUES, S. B. Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem. J.**, London, v. 75, p. 551, 1960.

HERMES-LIMA, M. Radicais de oxigênio e porfirias. **Ciência Hoje**, v. 13, n. 75, p. 16, 1990.

HITE, L. A.; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hopp-Seyler**, New York, v. 373, p. 381-385, 1992.

HOUSSAY, B.A. Classification des actions des venins de serpents sur l'organisme animal. **Compt. Rend. Soc. Biol.**, Boulevard, v. 105, p. 308, 1930.

HUANG, H-C.; LEE, C. Y. Isolation and pharmacological properties of phospholipases A₂ from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 207-217, 1984.

HUDIBURG, S. A.; ODELL, G.; BALIS, L.; OWNBY, C. L.; COLBERG, T.; JOHNSON,

- E.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Hemorrhagic toxins of *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 28, p. 612, 1990.
- HUGGETT, A. G. ; NIXON, D. A. Enzymic determination of blood glucose. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 66, p. 12p, 1957.
- IWANAGA, S.; OMORI, T.; OSHIMA, G.; SUZUKI, T. Demonstration of a proteinase with hemorrhagic activity in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 57, p. 392, 1965.
- JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. (VOGEL, A. I.; Ed.), ed. Bath Press: Avon, 1984. p. 368-373.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. **Ann. Rev. Pharmacol.**, Palo Alto, v. 8, p. 299, 1968.
- JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. Characterization of hemorrhagic toxins isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad banded copper-head) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 28, p. 613, 1990.
- KAISER, E.; MICHL, H. In: _____. **Die biochemie der tierischen gifte**. Viena: Franz Deuticke Wien, 1958. p. 217.
- KATO, H.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. The isolation and amino acid sequences of new pyroglutamylpeptides from snake venoms. **Experientia**, v. 22, p. 49-50, 1966.
- KELLAWAY, C. H. Animal poisons. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 8, p. 541, 1939.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that

metalloproteinases and nonezymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 265-293, 1992.

KLEINMAN, H.; MCGARVEY, M. L.; HASSEL, J. R.; STAR, V.; CANNON, F. B.; LAURIE, G. W.; MARTIN, G. R. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, Washington, v. 25, p. 312-318, 1986.

KOCHVA, S.; PERLMUTTER, C.; GITTER, S.; RECHNIC, J.; de VRIES, A. Studies on *Vipera palestinae* venom. Fractionation by ion exchange chromatography. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 9, p. 374, 1960.

KORNALIK, F.; MASTER, R. W. P. A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. **Toxicon**, Oxford, v. 2, p. 109-111, 1964.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. **Jap. J. Sci. and Biol.**, Tokyo, v.13, p. 43-51, 1960.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.**, New York, v. 30, p. 291-310, 1947.

LEITE, L. C. C.; FURTADO, M. F. D.; CORREA, T. C.; RAW, I. Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 102B, nn. 3, p. 515-520, 1992.

LO, T. P. Chemical studies of Formasan snake venoms. **J. Chin. Biochem. Soc.**, Taipei, v. 1, p. 39-46, 1972.

LOMONTE, B. **Tissue damage and inflammation induced by snake venoms**. Göteborg, 1994. Tese de Doutorado. Departament of clinical immunolgy, University of Göteborg, Göteborg, Sweden, and Instituto Clodomiro Picado, Faculty of Microbiology, University of Costa Rica, San José, Costa Rica.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, I. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAENO, H.; MITSUHASHI, S.; SAWAI, Y.; OKONOGI, T. Studies on Habu snake venom: enzymatic studies on the proteinase of Habu snake venom. **Jap. J. Microbiol.**, Tokyo, v. 3, p. 131, 1959.

MAENO, H.; MITSUHASHI, S.; SATO, R. Studies on Habu snake venom II - Studies on HB proteinase of Habu venom. **Jap. J. Microbiol.**, Tokyo, v. 4, p. 173, 1960.

MAENO, H. Biochemical analysis of pathological lesions caused by Habu snake venom with special reference to hemorrhage. **J. Biochem.**, Tokyo , v. 52, p. 343-350, 1962.

MALE, K. B.; LUONG, J. H. T.; GIBBS, B.; KONISHI, Y. An improved FIA biosensor for the determination of Aspartame in dietary food products. **App. Biochem. Biotechn.**, Clifton, v. 38, p. 189-201, 1993.

MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, O. B. Purification and properties of Bothrops protease A. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 104, p. 369-374, 1964.

MANDELBAUM, F. R.; CARRILLO, M.; HENRIQUES, O. B. Proteolytic activity of *Bothrops* protease A on the β chain of oxidized insulin. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 132, p. 508-514, 1967.

- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Source physical and biochemical characteristics of HF2, one of hemorrhagic factors in the venom of *B. jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAY, Y. **Animal, Plant and Microbial Toxins**. Vol I. London: Plenum Press, 1976. p.111-121.
- MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 95-972, 1982.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedii*. **Toxicon**, Oxford, v. 22, p. 193-206, 1984.
- MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA, M.T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 26(4): 379-85, 1988.
- MANUAL DE DIAGNOSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES OFIDICOS. NORMAS E MANUAIS TECNICOS. **Ministerio da Saude**, Centro de Documentacao do Ministerio da Saude, 1986.
- McKAY, D. G.; MOROZ, C.; de VRIES, A.; CSAVOSSY, I.; CRUSE, V. The action of hemorrhagin and phospholipase derived from *Vipera palestinae* venom on the microcirculation. **Labor. Invest.**, Baltimore, v. 22, p. 387, 1970.
- MEBS, D.; PANHOLZER, F. Isolation of a hemorrhagic principle from *Bitis arietans* (puff adder) snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 509-512, 1982.

- NAHAS, L.; DENSON, K.W.E.; MACFARLANE, R.G. A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, 12: 355-67, 1964.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X-activator components of Bothrops snake venoms. **Thromb. Haemost.**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 313-328, 1979.
- NAKANO, K.; INAMASU, Y.; HAGIHARA, S.; OBO, F. Isolation and properties of L-amino acid oxidase in the Habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. **Acta Medica Universitatis Kagoshimaensis**. v. 14, p. 229-239, 1972.
- NEUKON, H.; KUEDING, W. Fractionation on diethylaminoethylcellulose columns. Fractionation of neutral and acidic polysaccharides by ion-exchange column chromatography on diethylaminoethyl (DEAE)- cellulose. **Gen. Isol. Proc.**, v. , p. 14-17, 1962.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake). **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 231, n. 2, p. 309-319, 1984.
- OHSAKA, A. Fractionation of Habu snake venom by chromatography on CM-cellulose with special reference to biological activities. **Jap. J. Med. Sci. and Biol.**, v. 13, p. 199, 1960.
- OHSAKA, A.; IKEZAWA, H.; KONDO, H.; KONDO, S.; UCHIDA, N. Hemorrhagic activities of habu snake venom and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. **Brit. J. Exp. Path.**, London, v. 41, p. 478, 1960 a.

- OHSAKA, A.; IKEZAWA, H.; KONDO, H.; KONDO, S. Two hemorrhagic principles derived from Habu snake venom and their differences in zone electrophoretical mobility. **Jap. J. Med. Sci. and Biol.**, Tokyo, v. 13, p. 73, 1960 b.
- OHSAKA, A.; JUST, M.; HABERMANN, E. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 323, p. 415-428, 1973.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In: Lee, C. Y. **Snake Venoms**. Berlin: Springer Verlag, 1979. p.480-546.
- OKADA, K.; NAGAI, S.; KATO, H. A new pyroglutamylpeptide (Pyr-Lys-Ser) isolated from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. **Experientia**, v. 30, p. 459-460, 1974.
- OMORI, T.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. The relationship between the hemorrhagic and letal activities of japanese mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii*) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 2, p. 1, 1964.
- OMORI-SATOH, T.; OHSAKA, A.; KONDO, S.; KONDO, H. A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in the venom *Trimeresurus flavoviridis*. **Toxicon**, Oxford, v. 5, p. 17, 1967.
- OMORI-SATOH, T.; OHSAKA, A. Purification and some properties of hemorrhagic principle I in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 207, p. 432-444, 1970.
- OSHIMA, G.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Studies on snake venoms. XVIII. An improved method for purification of the proteinase b from the venom of *Agkistrodon*

- halys blomhoffii* and its physicochemical properties. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 64, n. 2, p. 215-225, 1968.
- OSHIMA, G.; OMORI-SATOH, T.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Studies on snake venom hemorrhagic factor (HR-I) in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 1483-1494, 1972.
- OVADIA, M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palestinae*. **Toxicon**, Oxford, v. 16, p. 479-487, 1978.
- OWNBY, C. L.; KAINER, R. A.; TU, A. T. Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. **Am. J. Path.**, Hagerstown, v. 76, p. 401-415, 1974.
- OWNBY, C. L.; BJARNASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Path.**, Hagerstown, v. 93, n. 1, p. 201-218, 1978.
- OWNBY, C. L. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu, A. T. **Rattlesnake Venoms**. Their Actions and Treatment. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 163-209.
- PESSATTI, M. L. P.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F. D.; GUIMARÃES, M. F.; ZANETTE, L. R. S.; COSTA, W. T.; BARON, N. Screening of Bothrops snake venoms for L-amino acid oxidase activity. **App. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 51/52, p. 197-210, 1995.
- PFLEIDERER, G.; SUMIK, G. Investigation of snake venom enzymes. I. Separation of rattlesnake venom proteinases by cellulose ion-exchange chromatography. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 51, p. 482-493, 1961.

PHILIPOT, V. B.; DEUTSCH, H. F. Inhibition and activation of venom proteases. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 21, p. 524, 1956.

POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. **Brit. J. Exp. Path.**, London, v. 20, p. 132, 1939.

PORGES, N. Snake venoms, their biochemistry and mode of action. **Science**, Washington, v. 117, p. 47, 1953.

QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 341-345, 1985.

REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R. Biophysical properties and amino acid composition of *Bothrops* proetase A, a proteolytic enzyme isolated from venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 421-427, 1983.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Amer. J. Phys.**, Bethesda, v. 156, p. 261-273, 1949.

RADU, G. L.; COULET, P. R. Characteristics and performance of a novel L-amino acid enzyme electrode. **Analysis**, Paris, v. 21, p. 101-105, 1993.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: W. Bucherl; E. Buckley. **Venomous Animals and Their Venoms**, vol. II, Venomous Vertebrates. New York: Academic Press, 1971. p. 345-384.

- SÁNCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Purification and characterization of the hemorrhagic factor I from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Toxicon**, Oxford, v. 25, p. 611-619, 1987.
- SÁNCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from Bushmaster snake (Surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 249-260, 1991.
- SÁNCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A.; MANDELBAUM, F. R.; DINIZ, C. R. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1074, p. 347-356, 1991.
- SÁNCHEZ, E. F.; DINIZ, C. R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the hemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS**, Amsterdam, v. 282, n 1, p. 178-182, 1991 a.
- SATAKE, M.; MURATA, Y.; SUZUKI, T. Chromatography separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 53, p. 438-446, 1963.
- SINGER, T. P.; KEARNEY, E. B. The L-amino acid oxidase of snake venom. I. Prostetic group of the L-amino acid oxidase of mocasin venom. **Arch. Biochem.**, New York , v. 27, p. 348-362, 1950.
- SKARNES, R. C. L-amino acid oxidase, a bactericidae system. **Nature**, Hamshire, v. 225, p. 1072-1073, 1970.

SLOTTA, K. Chemistry and biochemistry of snake venoms. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 12, p. 406, 1955.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1129-1141, 1991.

SUGIURA, M.; SASAKI, M.; ITO, Y.; AKATSUKA, M.; OIKAWA, M.; KAKINO, M. Purification and properties of L-amino acid oxidase from the venom of Kanko Ku Mamushi (*Agkistrodon caliginosus*). **Snake**, v. 7, p. 83-90, 1975.

TAKAHASHI, T.; OHSAKA, A. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 198, p. 293-307, 1970 a.

TAKAHASHI, T.; OHSAKA, A. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*, complete separation of the principles from proteolytic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 207, p. 65-75, 1970 b.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of venoms from snakes of the genus *Vipera* (true adders). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 96B, p. 683-688, 1990.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 100B, n. 2, p. 361-365, 1991.

- TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N. Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 323-327, 1991.
- TAN, N. H.; SWAMINATHAN, S. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 967-973, 1992.
- TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A. A. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant, and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 103C, n. 2, p. 299-302, 1992.
- TAN, N. H.; LIM, K. K.; ISKANDAR, M.; JAAFAR, N. An investigation into the antigenic cross-reactivity of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom neurotoxin, phospholipase A₂, hemorrhagin and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 865-872, 1993.
- THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949-956, 1983.
- TU, A. T.; HOMMA, M.; HONG, B. S. Hemorrhagic, myonecrotic, thrombotic and proteolytic activities of viper venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 6, p. 175-178, 1969.
- TU, A.T. **Venoms. Chemistry and Molecular Biology**. John Wiley, New York, 1977.
- TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: _____. **Rattlesnake venoms, their actions and treatment**. New York: Marcel Dekker, 1982.

- UMAÑA, V. Purificación y separación de isoenzimas de L-aminoacido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Tropical**, San José, v. 30, p. 59-64, 1982.
- VAN HEYNINGEN, W. E. In: NEURATH, H.; BAILEY, K. **The proteins**. New York: Academic Press, 1954, p. 345.
- VIDAL, J. C.; STOPPANI, A. O. M. Isolation and properties of an inhibitor of phospholipase A from *Bothrops neuwiedii* venom. **Archs. Biochem. Biophys.**, New York, v. 147, p. 66-76, 1971.
- WELLNER, D.; MEISTER, A. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 235, n. 7, p. 2013-2018, 1960.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. *Offset publication n.58*. Geneve, 1981.
- XU, X.; WANG, C.; LIU, J.; LU, Z. Purification and characterization of hemorrhagic components from *Agkistrodon acutus* (hundred pace snake) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 633-644, 1981.
- YAMAKAWA, M.; NOZAKI, M. & HOKAMA, Z. Fractionation of Sakishima-habu (*Trimesurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic, and edema-forming activities of the fractions. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAI, Y. **Animal, Plant and Microbial Toxins**, Vol.I. London: Plenum Press, 1976.
- ZELLER, E. A.; MARITZ, A. Über eine neue l-aminosäure-oxydase (ophio-l-aminosäure-oxydase). **Helvetica Chim. Acta**, Postlach, v. 28, p. 365-379, 1945.
- ZELLER, E. A. Enzymes of snake venoms and their biological significance. In: NORD, F. **Advances Enzimology**. Londres: Interscience publishers, 1948. p. 459-496.

Screening of *Bothrops* Snake Venoms for L-Amino Acid Oxidase Activity

MARCOS L. PESSATTI,¹ JOSÉ D. FONTANA,¹
MARIA F. D. FURTADO,² MANOEL F. GUIMARAES,¹
LORENZO R. S. ZANETTE,¹ WALLIANA T. COSTA,¹
AND MADALENA BARON*.¹

¹LQBB—Biomass Chemo/Biotechnology Laboratory,
Department of Biochemistry, UFPR—Federal University of Parana
PO Box 19046 (81531-970), Curitiba—PR, Brazil;
and ²LH—Herpetology Laboratory, IB—Butantan Institute,
São Paulo—SP, Brazil

ABSTRACT

Toxins, enzymes, and biologically active peptides are the main components of snake venoms from the genus *Bothrops*. Following the venom inoculation, the local effects are hemorrhage, edema, and myonecrosis.

Nineteen different species of Brazilian *Bothrops* were screened for protein content and L-amino acid oxidase activity. *B. cotiara*, formerly found in the South of Brazil, is now threatened with extinction. Its venom contains a highly hemorrhagic fraction and, as expected from the deep yellow color of the corresponding lyophilized powder, a high L-amino acid oxidase (LAO) activity was also characterized. Flavin adenine dinucleotide (FAD) is its associate coenzyme. *B. cotiara* venom LAO catalyzed the oxidative deamination of several L-amino acids, and the best substrates were methionine, leucine, tryptophan, and phenylalanine, hence, its potential application for the use in bio-sensors for aspartame determination and for the removal of amino acids from plasma. High levels for LAO were also found in other species than *B. cotiara*. In addition, the technique of isoelectric focusing (IEF) was employed as a powerful tool to study the iso- or multi-enzyme distribution for LAO activity in the *B. cotiara* snake venom.

Index Entries: *Bothrops cotiara* venom; LAO/L-amino acid oxidase; hemorrhagic activity; LAO isoelectrofocusing; LAO zymogram.

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

INTRODUCTION

Bothrops is a genus of poisonous snakes found in Central and South America (1). The clinical symptoms provoked by the venoms, after inoculation, are characterized by local lesions, that is, hemorrhage, edema, and myonecrosis, as well as cardiovascular alterations, coagulation disorders, and renal damages (2). These pathologies are attributed to a complex mixture of bioactive components, like enzymes, hemorrhagic factors, and myotoxins (3). Some enzymatic activities have been investigated in the bothropic venoms, including studies about protease (4), phospholipase A2 (5,6), and thrombin-like enzyme (7).

The purpose of this investigation was to examine the L-amino acid oxidase (LAO) activity in venoms obtained from 19 species of the genus *Bothrops*, very widespread in Brazil. There are a few reports about the occurrence of LAO in bothropic venoms, but most studies were reported for other genera, such as *Crotalus* (8) and *Pseudechis* (9).

LAO is being currently used for the removal of free L-amino acids from human plasma in order to improve the quantitative estimation of δ -aminolaevulinic acid (ALA) in cases of congenital and AIDS-provoked porphyrias, saturnism, and tyrosinemia (10,11).

Another application refers to a biosensor system combining an immobilized pronase column and the LAO electrode connected in series. Such an instrument is being developed for the determination of aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) in dietary food products (12).

Under this focus, the preparation of LAO from Brazilian *Bothrops* species can be envisaged as a valid biotechnological prospect.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Brazilian bothropic snake venoms were supplied by the Butantan Institute, Sao Paulo as lyophilized powders. Commercial snake venom preparations were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All samples were maintained under refrigeration. Bovine albumin (fraction V), Coomassie brilliant blue G and R-250, peroxidase (40 and 80 U/mg) from horseradish, L-amino acids, and flavin adenine dinucleotide (FAD) were obtained from Sigma. Other reagents were of analytical grade.

Protein Assay

Venom solutions were assayed for protein concentration according to the method of Bradford (13). The triplicate tests with venom samples (50 μ g in a volume of 0.1 mL of 100 mM, pH 7.5, Tris-HCl buffer) were carried

out using 5 mL of protein reagent, vortexing the content in the tube, and measuring the absorbance at 595 nm with Varian DMS-80 spectrophotometer (Intralab, Sao Paulo, Brazil), after 20 min. The standard curve of bovine albumin was also made in the presence of the same buffer, in the 10–100 μ g protein range.

L-Amino Acid Oxidase Activity

Venom solutions were analyzed by measuring the hydrogen peroxide generated during the oxidation of L-amino acids as described by Aisaka and Terada (14). The reaction mixture contained 2 mM of L-leucine (or other indicated L-amino acid), 16 mM, pH 7.5, Tris-HCl, 0.04 mM of 4-aminoantipyrine, 0.7 mM of phenol, 5 U of peroxidase, and enzyme (5 μ g of venom in a volume of 10 μ L with the same buffer) in a total volume of 3.0 mL. After incubation at 37°C for 20 min, the absorbance of the quinoneimine dye formed was measured at 500 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that produces 1 nmol of hydrogen peroxide/min. The standard curve of hydrogen peroxide was calculated using solutions containing 8.3–166.0 nmol of H₂O₂.

Coenzyme Spectral Analysis

Flavin adenine dinucleotide (4.2 mM in 0.1M, pH 7.0, phosphate buffer) spectrum was recorded taking advantage of its multiband feature at 263, 375, and 450 nm (15). A solution of *B. cotiara* snake venom (10 mg/mL) was analyzed in the same conditions with spectral scanning at 100 nm/min and chart speed of 2 cm/min.

Analytical Isoelectric Focusing

A *B. cotiara* snake venom solution (0.8 mg in 40 μ L of 0.09% sodium chloride) was applied in the middle position of an Ampholine precast polyacrylamide gel (PAG) plate (80 × 55 × 1 mm), pH range from 3.5 to 9.5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The electrode solutions were 1M phosphoric acid for the anode and 1M sodium hydroxide for the cathode, and the initial running conditions were 150 V, 8 mA and 1 W. After 3.5 h, the voltage was increased to 450–500 V until the final drop of the current to <0.3 mA. One-half of the gel was stained with coomassie, and the other half was dipped in the reaction system for the LAO activity for 10–20 min at room temperature. The coomassie staining solutions were 11.6% trichloroacetic acid and 3.4% sulphosalicylic acid for fixation, 0.25% coomassie brilliant blue R-250 in methanol:acetic acid:water (50:7:43) for staining, and 1-propanol:methanol:acetic acid:water 50:50:50:100) for destaining. For the LAO reaction in this technique *o*-dianisidine was used as coupling agent (16) instead of 4-aminoantipyrine.

High-Performance Liquid Chromatography Analysis

The bimodular SC 600E/WISP 172 machine (Waters/Millipore, Milford, MA) was equipped with a 484 tunable absorbance detector at 280 nm and sensitivity 1. A sample of *B. cotiara* snake venom (150 μ g in 15 μ L of 50 mM, pH 7.5, Tris-HCl buffer) was eluted with the same buffer (flow rate = 1 mL/min; 420 psi) through a Protein Pak DEAE-5PW column (7.5 mm \times 7.5 cm) and the gradient operated from 0 to 100% with 50 mM NaCl.

Metal Analysis

A venom sample of *B. cotiara* (1.0 mg/mL in 0.1M, pH 7.5, phosphate buffer) was analyzed for zinc content on a CG atomic absorption spectrophotometer.

Hemorrhagic Activity of Determination

The assay for the determination of hemorrhagic activity (17) in *B. cotiara* venom was made on Wistar mice weighing between 18 and 22 g. Samples containing 1, 5, 15, 30, and 60 μ g of venom (sample volume of 100 μ L in 0.09% NaCl) were injected id to a depilated area in each different animal. After 2 h, the intensity of the skin responses was estimated from the inside face. The cross diameters of each hemorrhagic spot were measured in millimeters (mm), and the area of each spot was taken as indicator for the intensity of the response. The negative control test was carried out inoculating only 0.09% NaCl.

RESULTS AND DISCUSSION

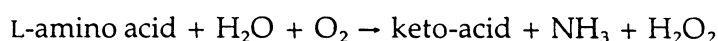
Considering the animal kingdom as a rich source of bioactive and/or poisonous compounds, the Viperidae family, including the three main genera *Bothrops*, *Crotalus*, and *Lachesis*, contributes venoms of high toxicity. A feature that characterizes this snake family is the presence of solenoglyphic fangs, which facilitates the venom inoculation (18).

Most of the snake bites in Latin America, from Mexico to Argentina, are caused by species of the genus *Bothrops*. Venoms from these snakes induce a pathophysiological picture characterized by local damage, as hemorrhage, edema, and myonecrosis, and systemic effects, involving cardiovascular, coagulation, and renal alterations. The antivenom administration, rapidly after venom inoculation, is able to neutralize the systemic disorders, but it is not totally efficacious in the neutralization of local tissue damage (2). Owing to the relevance of local effects induced by *Bothrops* snakes, it becomes necessary to look for a better understanding of the inflammatory events (19) that follow envenomation, in order to develop better therapeutic strategies complementary to the conventional serotherapy. Moreover, the isolation, fractionation, and characterization

of the bioactive compounds in snake venoms are an important task to make possible their use as powerful tools in the study of basic inflammatory mechanisms. These procedures could also allow a more rational basis for selecting the venoms to be used in the production of antivenoms.

Toxins, enzymes, and biologically active peptides are found in varying quantities in snake venoms, depending on the species. In a comparative study of enzymatic activities using several animal venoms obtained from snake, lizard, toad, scorpion, spider, bee, wasp, and ant, it was observed that snake venom is the richest source of degradative enzymes (20). One of them is LAO, originally studied in the Australian mulga snake from the *Pseudechis* genus (9). Since most of Brazilian *Bothrops* venoms display a marked yellow color and LAO is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-containing enzyme, we decided to investigate the occurrence of such a kind of enzyme in 19 samples arising from different species. The interest was further extended to hemorrhagic activity, and our main research focus was on *Bothrops cotiara*, a snake formerly found in the South of Brazil (States of Parana and Santa Catarina).

LAO catalyzes the oxidative deamination of L-amino acids (21) according to the reaction that follows:



The 19 species of *Bothrops* displayed a quite variable profile when LAO activity was assayed with 4-aminoantipyrine as chromogen (Table 1). It may be observed that six venoms presented SA above 1000 U/mg, three venoms below 100 U/mg, and the 10 remaining between these two values. The sp. *pradoi* venom showed the highest value, whereas the sp. *itapetingae* venom was almost devoid of LAO activity. The venom of *B. cotiara* exhibited a high level for LAO. The protein contents of the examined samples were around 0.60–1.16 mg/mg of lyophilized venom, when the protein determination was carried out by the method of Bradford (13). A value of 0.78 mg of protein/mg of venom was found for sp. *cotiara* in accordance with the result obtained by Furtado et al. (23). Tris interference was higher when protein estimation was carried out by the method of Lowry.

Since two commercial snake venom preparations were available, their LAO specific activities were also assayed, as shown in the Table 2, and the results were smaller than that of *B. cotiara*. A interesting feature of the Brazilian bothropic venoms showing a high level of LAO was the deep yellow color that could be associated with the presence of the usual FAD prosthetic group of LAOs. In order to confirm this, a sample of *B. cotiara* venom was spectrally scanned from 700 to 200 nm (Fig. 1A). Two major absorption bands (465 and 390 nm) effectively corresponded to those observed for the LAO prepared from the *Crotalus adamanteus* venom (23). Furthermore, the pure coenzyme assayed under the same conditions displayed the same two bands and one additional around 270 nm (Fig. 1B). In fact, these are the routine bands that characterize FAD (15).

Table 1
L-Amino Acid Oxidase Activity
and Protein Concentration in Genus *Bothrops* Snake Venoms

Snake	Habitat	Protein mg protein/ mg venom	LAO activity, ^a U/mL	Specific activity, ^b U/mg
<i>Bothrops</i>				
<i>alternatus</i>	—	1.00	314.95	629.90
<i>atrox</i>	Amazonia	0.80	478.29	1195.73
<i>billineatus</i>	Amazonia	0.68	512.49	1507.32
<i>brazili</i>	Amazonia	0.82	194.39	474.12
<i>castelnaudi</i>	—	0.76	197.00	518.42
<i>cotiara</i>	PR, SC	0.78	386.74	991.64
<i>erythromelas</i>	—	1.00	12.38	24.76
<i>fonsecai</i>	PB, SP, RJ, MG	0.80	273.92	684.80
<i>hyoprurus</i>	Amazonia (N)	0.60	19.94	66.47
<i>insularis</i>	Queimada Grande Island	0.86	355.15	825.93
<i>itapetiningae</i>	SP, MT, GO	0.96	2.13	4.44
<i>jararaca</i>	(SE)	0.72	314.95	874.86
<i>jararacussu</i>	(SE)	1.16	391.87	675.64
<i>leucurus</i>	—	0.60	320.08	1066.93
<i>marajoensis</i>	Marajo Island	0.68	214.91	632.09
<i>mojeni</i>	GO, MT, TO, MG SP, PR, (NE)	0.78	530.33	1359.82
<i>neuwiedii</i>	All states, except Amazonia	1.00	655.97	1311.94
<i>pirajai</i>	BA(S)	0.64	112.29	350.91
<i>pradoi</i>	ES	0.88	666.42	1514.59

^aL-Leucine was used as substrate.

^bnmol H₂O₂·min⁻¹·mg⁻¹ protein.

LAO = L-Amino acid oxidase.

Regions: SE = southeast, NE = northeast, S = south, N = north.

States: AC = Acre, AM = Amazonas, AP = Amapa, BA = Bahia, ES = Espirito Santo, GO = Goias, MA = Maranhao, MG = Minas Gerais, MT = Mato Grosso, PA = Para, PB = Paraiba, PR = Parana, RJ = Rio de Janeiro, RO = Rondonia, RR = Roraima, SC = Santa Catarina, SP = Sao Paulo, TO = Tocantins.

Amazonia: AM, PA, MA, AC, AP, RO, RR.

We also adopted the usual substrates L-leucine and L-phenylalanine to assay the LAO activity against increasing concentrations of *B. cotiara* venom. The curves in the Fig. 2A and B showed that the relationship between microgram of venom and absorbance, at 500 nm, is not linear for amounts of venom up to 15 µg. In all instances, the LAO activity measurements, using leucine, were higher than those obtained with phenylalanine.

Table 2
L-Amino Acid Oxidase Activity^a
in Commercial Snake Venoms

Commercial snake venom	Specific activity ^b U/mg
<i>Bothrops atrox</i> LAO (Sigma A-4257)	690.42
<i>Crotalus atrox</i> LAO (Sigma A-5147)	682.71

^aL-Leucine was used as substrate.

^bnmol H₂O₂·min⁻¹·mg⁻¹ protein.

Table 3 summarizes the specific LAO activity of *B. cotiara* venom evaluated with these usual, as well as several unusual substrates. Among the latter, some of them underwent a small degree of oxidative deamination by the enzyme. The decreasing order of activity was cystine, histidine, tyrosine, isoleucine, and cysteine. The highest activities were obtained for methionine, leucine, tryptophan, and phenylalanine. Oxidative deamination of other amino acids by *Bothrops cotiara* may be neglected.

Our study of the isoenzymes distribution for LAO in *B. cotiara* venom was previously carried out by conventional electrophoresis using twin cellulose acetate strips and 50 mM, pH 8, Tris-HCl as running buffer. One strip was stained with Coomassie, and the other revealed for LAO activity using leucine/*o*-dianisidine. Coomassie stain showed eight bands, but its counterpart zymogram only three. Protein profile had a large and strong band with low pI, which lacks LAO activity. In order to improve the resolution of the proteic components from *B. cotiara* venom, it was submitted to isoelectric focusing (IEF) zymogram in the pH range of 3.5–9.0 using a polyacrylamide gel plate, as shown in Fig. 3. The number of bands visualized by coomassie corresponded to 30, whereas the active bands for LAO (using leucine as substrate) were 19. Moreover, confirming the preliminary cellogel result, strong coomassie-positive bands in the acidic region were not detected with the enzymatic reaction. The reason for this could be enzyme partial inactivation at the lower pH zone. Repeating the zymogram using other substrates (e.g., phenylalanine), the electrophoretic profiles were similar to that obtained with leucine, but different intensities of color for the bands were noted, depending on the chemical nature of L-amino acid. Enzyme activity with methionine was the strongest, whereas activity with serine was negative in accordance with the results obtained in the spectrophotometric assay. In this way, it is apparent that the LAO zymogram, using *o*-dianisidine as chromogen, is a powerful tool to screen LAO activity using several L-amino acids as substrates. As one example, the zymogram with *B. atrox* venom led to a quite different zymogram profile that contained only six LAO-positive bands (results not shown).

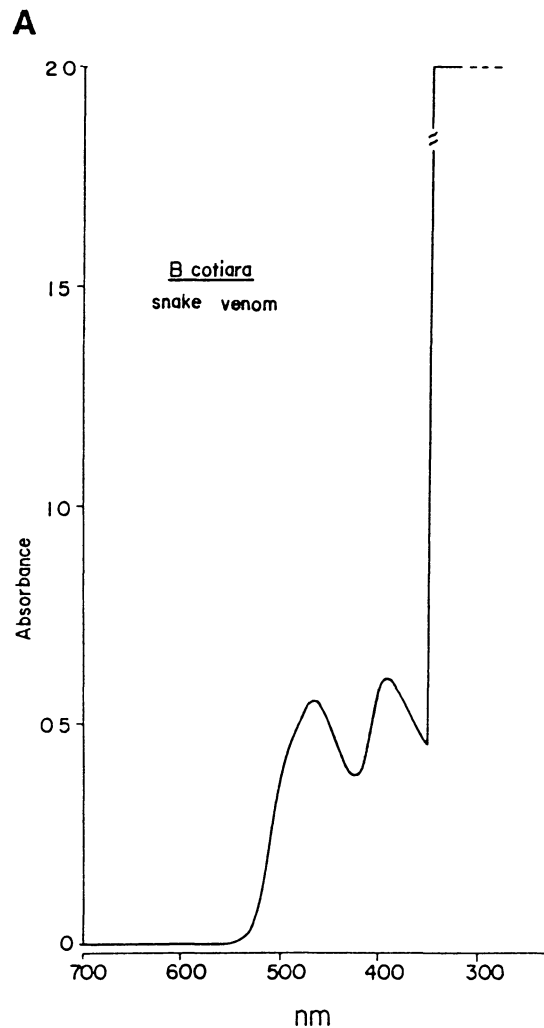


Fig. 1. UV-visible spectral analyses. A = *Bothrops cotiara* snake venom.

Since the IEF analysis was able to provide a consistent, but only qualitative profile of the active protein components present in *cotiara* venom, we decided to submit this venom to high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Protein Pak DEAE-5PW column in order to obtain quantitative information at least of the protein distribution in the sample. The chromatographic pattern observed in Fig. 4 shows 21 protein peaks for *cotiara* venom. Four of them were prominent and appeared well separated in the salt gradient. This result was coincident with that reported by Furtado et al. (3), who analyzed the venom from the same species using a Mono-Q column, thus obtaining 19 peaks. Since charge difference was the protein property explored in both IEF and HPLC techniques, the respective profiles agreed.

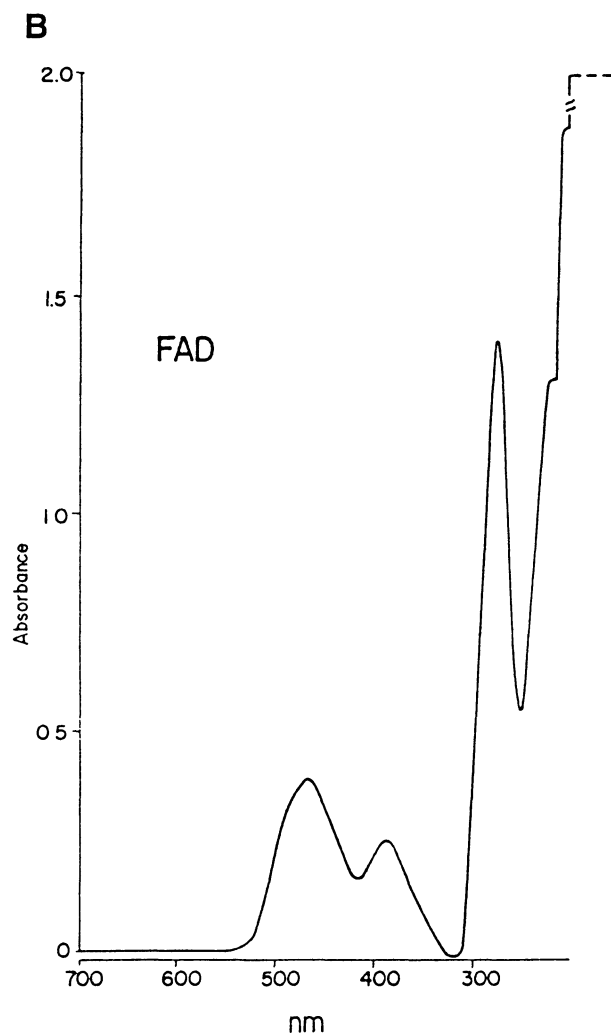


Fig. 1. (continued). B = Flavine adenine dinucleotide (FAD).

The occurrence of LAO in almost all venoms from Brazilian *Bothrops* snakes could indicate that this particular enzyme activity is involved with the toxic action of these venoms. The redox catalysis they bring about could also have a complementary action to the other activities already demonstrated in snake venoms, as for example, the hemorrhagic activity, that is also very characteristic for bothropic venoms (2). Amino acid oxidative deamination, in fact, may complement the action of any extensively proteolytic enzyme.

When assaying *B. cotiara* venom for hemorrhagic activity (Fig. 5), it was noted, after 2 h, that a defined hemorrhagic spot could be observed even when the venom protein amount was limited to 1 μ g. Increase by 5 to 60 \times the crude venom dose produced an increase in the intensity of the

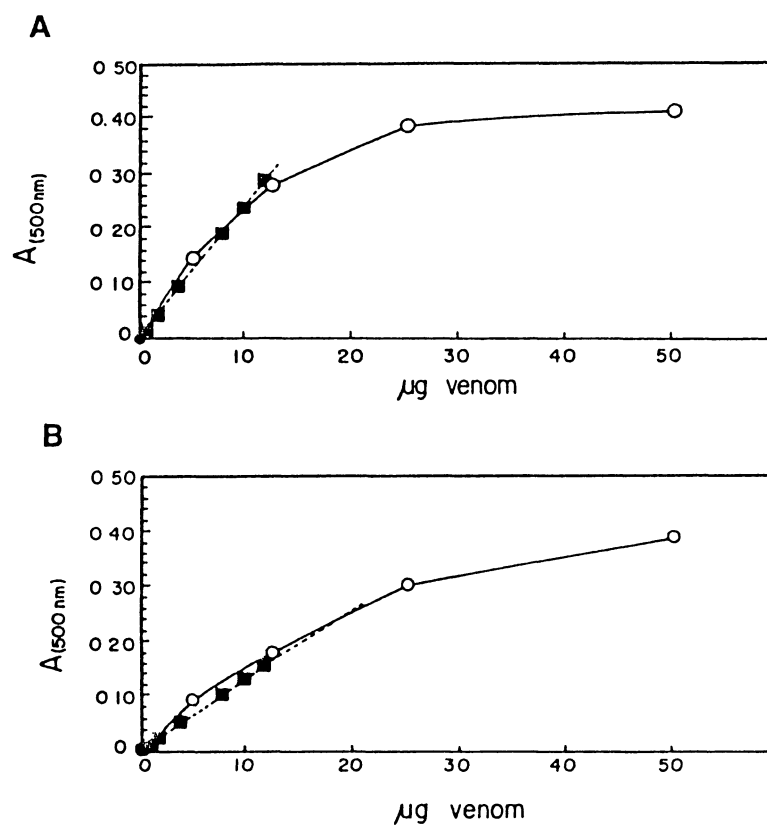


Fig. 2. *B. cotiara* venom LAO activity. * A=L-leucine substrate. B=L-phenylalanine substrate. (---○---○--- = assay range: 5-50 μg of venom). (-■-■- = assay range: 1-12 μg of venom). (*) 4-aminoantipyrine as chromogen.

Table 3
L-Amino Acid Oxidase Activity^a
of *Bothrops cotiara* Snake Venom Using Various Substrates

Amino acid	Specific activity ^b U/mg
L-Methionine	917.58
L-Leucine	883.84
L-Tryptophan	717.74
L-Phenylalanine	582.79
L-Cystine	46.61
L-Histidine	40.39
L-Tyrosine	25.89
L-Isoleucine	18.12
L-Cysteine	7.77

^a2 mM amino acids as substrates.

^bnmol $H_2O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ protein.

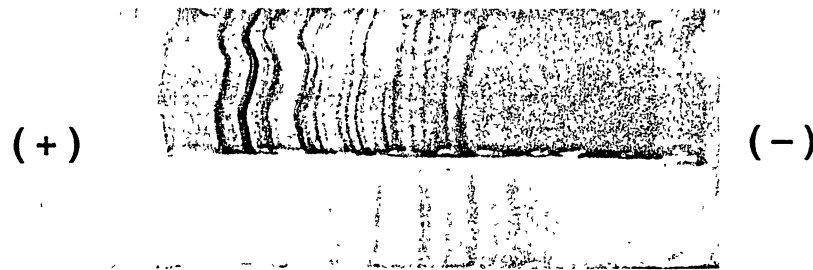


Fig. 3. PAGE isoelectric focusing-based zymogram for *B. cotiara* venom. Bottom: Coomassie staining. Top: LAO reaction with *o*-dianisidine as chromogen.

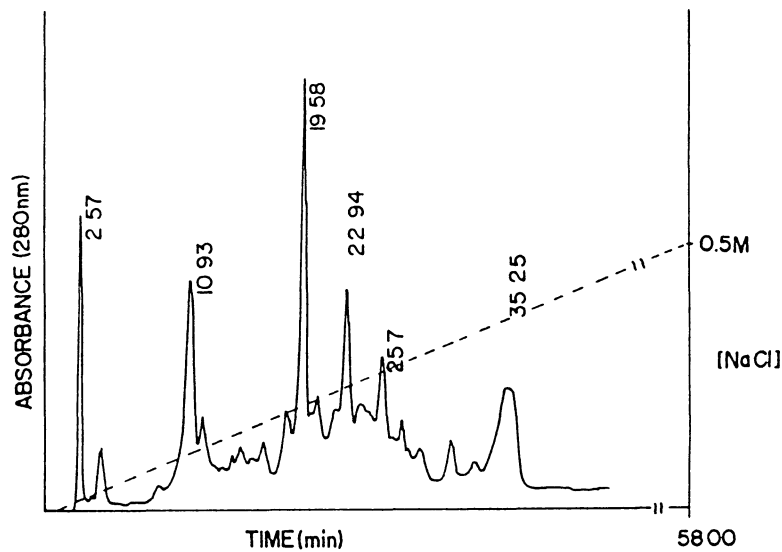


Fig. 4. HPLC analysis of *B. cotiara* venom (details in Materials and Methods).

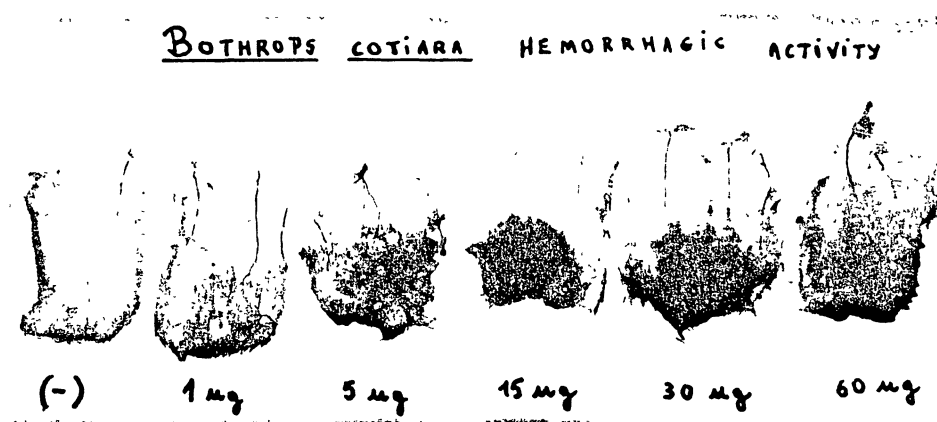


Fig. 5. Hemorrhagic activity assay of *B. cotiara* venom.

Table 4
Dose-Response Correlation for Hemorrhage
Following *B. cotiara* Venom id Injection in Mice

Venom, μg	Area, mm^2
1	212
5	270
15	311
30	354
60	477

localized hemorrhagic spot, but not in proportion to the dose (Table 4). Since many hemorrhagic components isolated from snake venoms are Zn^{2+} -containing proteases (2), *B. cotiara* venom was analyzed by atomic absorption, and the content of 990 μg zinc/g venom corresponded to the values generally reported for venoms from different snake species (24). Thus, it is supposed that the hemorrhagic toxins in the *B. cotiara* also depend on the presence of Zn^{2+} to exhibit their activities.

Of the analyses investigated up to now, it can then be suggested that the *B. cotiara* venom LAO and hemorrhagic activities play some concomitant or at least sequential role in tissue lesion following the snake bite.

Moreover, LAO activity was detected in almost all venoms from Brazilian bothropic snakes (Table 1), indicating that it is an ordinary enzymatic activity within *Bothrops* genus. The practical application to be envisaged for the preparation of LAO from Brazilian bothropic species is the possibility to design a sensitive LAO electrode through enzyme immobilization in order to detect L-amino acid (25). This type of biosensor, combining pronase, is useful in the food industries for aspartame determination in dietary food products (12). Another application for LAO is its use for the removal of free L-amino acids from human plasma to improve the quantitative estimation of δ -aminolaevulinic, a precursor of porphyrins (10,11). In addition to the cases of congenital porphyrias, other pathological conditions, like saturnism, tyrosinemia, and AIDS-provoked porphyrias, also require a reliable quantitative evaluation of δ -aminolaevulinic. *B. cotiara* venom could fulfill this need.

CONCLUSIONS

The majority of the venoms obtained from Brazilian bothropic snakes, which are widely spread in that country, showed variable levels of LAO activity, when leucine was used as substrate. Enzyme-associated FAD explained the intense yellow color of *B. cotiara* venom. The IEF zymogram for venom LAO reaction using polyacrylamide gel revealed a number of

enzyme bands. Using different substrates, the reaction for LAO proceeded with different rates and final intensities, the strongest reaction being with methionine, a very important amino acid when dealing with feeder and fodder (e.g., single-cell protein quality evaluation). Therefore, the venoms of *Bothrops cotiara* and more closely related Brazilian species deserve future biotechnological applications. The venom of *B. cotiara* also presented intense hemorrhagic activity when injected intradermally on mice.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq and CAPES (funding agencies of Brazil). We are very grateful to Edmir Gonçalves from Laboratório de Análises Clínicas Frischmann-Aisengart and Sérgio A. A. Morato from Museu de História Natural de Curitiba. The help of Nancy P. C. Albuquerque and José A. Florêncio is greatly appreciated.

REFERENCES

1. Kamiguti, A. S. and Cardoso, J. L. C. (1989), *Toxicon* **27**(9), 955-963.
2. Gutierrez, J. M. and Lomonte, B. (1989), *Mem. Inst. Butantan* **51**(4), 211-223.
3. Leite, L. C. C., Furtado, M. F. D., Correa, T. C., and Raw, I. (1992), *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**(3), 515-520.
4. Lomonte, B. and Gutierrez, J. M. (1983), *Rev. Biol. Trop.* **31**(1), 37-40.
5. Reichl, A. P., Serrano, S. M. T., Assakura, M. T., and Mandelbaum, F. R. (1989), *Mem. Inst. Butantan* **51**(4), 225-237.
6. Bultron, E., Thelestam, M., and Gutierrez, J. M. (1993), *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 253-259.
7. Tanaka, N., Nakada, H., Itoh, N., Mizuno, Y., Takanishi, M., Kawasaki, T., Tate, S., Inagaki, F., and Yamashina, I. (1992), *J. Biochem.* **112**, 68-74.
8. Wellner, D. and Meister, A. (1960), *J. Biol. Chem.* **235**(7), 2013-2018.
9. Stiles, B. G., Sexton, F. W., and Weinstein, S. A. (1991), *Toxicon* **29**(9), 1129-1141.
10. Hermes-Lima, M. (1990), *Ciencia Hoje* **13**(75), 16, 199.
11. Bechara, E. J. H. (1993), personal communication.
12. Male, K. B., Luong, J. H. T., Gibbs, B., and Konishi, Y. (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**(3), 189-201.
13. Bradford, M. M. (1976), *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
14. Aisaka, K. and Terada, O. (1981), *Agric. Biol. Chem.* **45**(10), 2311-2316.
15. Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M. (eds.) (1991), in *Data for Biochemical Research*. Clarendon Press, Oxford, pp. 124-125.
16. Huggett, A. S. G. and Nixon, D. A. (1957), *J. Biochem.* **66**, 12.
17. Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., and Murata, R. (1960), *Jpn. J. M. Sci. Biol.* **13**, 43-51.
18. Jared, C. and Furtado, M. F. D. (1988), *Cien. Hoje* **7**(42), 27-32.

19. Lomonte, B., Tarkowski, A., and Hanson, L. A. (1993), *Inflammation* 17(2), 93-105.
20. Tan, N. and Ponnudurai, G. (1992), *Comp. Biochem. Physiol.* 1003C(2), 299-302.
21. Whelan, W. (ed.) (1974), *The Enzyme Commission*, Academic, pp. 176-177.
22. Furtado, M. F. D., Colletto, G. M. D. D., and Silva, W. D. (1991), *Mem. Inst. Butantan* 53(2), 149-159.
23. Curti, B., Massey, V., and Zmudka, M. (1968), *J. Biol. Chem.* 243(9), 2306-2314.
24. Friedrich, C. and Tu, A. T. (1971), *Biochem. Pharmacol.* 20, 1549-1556.
25. Radu, G. L. and Coulet, P. R. (1993), *Analisis* 21, 101-105.